

**Untersuchungen
über in-vivo-Funktionen
der cAMP-abhängigen Proteinkinase
während der Entwicklung
von Dictyostelium discoideum**

Birgit Wetterauer

Disbui. München

1989



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554801_0021

Untersuchungen über *in-vivo*-Funktionen der
cAMP-abhängigen Proteinkinase
während der Entwicklung von *Dictyostelium discoideum*

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Birgit Wetterauer
aus München

August 1988

1. Berichterstatter: Prof. Harry K MacWilliams

2. Berichterstatter: Prof. Charles N. David

Sondergutachter: Prof Günther Gerisch

Tag der mündlichen Prüfung: 26.7.1989

1.	<u>GLIEDERUNG</u>	1
2.	<u>EINLEITUNG</u>	6
3.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	12
4.	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	14
4.1.	<u>DICTYOSTELIUM-ZELLKULTUR</u>	14
4.1.1.	<u>verwendete Stämme</u>	14
4.1.2.	<u>Anzucht in Suspension</u>	14
4.1.2.1.	Schüttelkulturen	14
4.1.2.2.	Fermenter	14
4.1.3.	<u>Anzucht auf Agarplatten</u>	15
4.1.3.1.	Normalagarplatten mit <i>E. coli</i> B/2	15
4.1.3.2.	SM-Agarplatten mit <i>Klebsiella aerogenes</i>	15
4.1.4.	<u>Entwicklungsinduktion</u>	15
4.1.4.1.	Filterentwicklung	15
4.1.4.2.	Suspensionsentwicklung	16
4.1.5.	<u>Konservierung der Stämme</u>	16
4.1.5.1.	Sporen	16
4.1.5.2.	Amöben	16
4.2.	<u>PROTEINCHARAKTERISIERUNG</u>	17
4.2.1.	<u>SDS-PAGE und Western-Blot</u>	17
4.2.2.	<u>Isoelektrische Fokussierung, 2D-Gele</u>	18
4.2.3.	<u>Gesamtproteinfärbung von Gelen</u>	19
4.2.3.1.	Coomassiefärbung	19
4.2.3.2.	Silberfärbung	19
4.2.4.	<u>Molekulargewichtsstandards</u>	20
4.2.5.	<u>Aufreinigung der Regulatorischen Untereinheit</u>	20
4.2.5.1.	cAMP-Bindungsassay	20
4.2.5.2.	Aufreinigungsprotokoll	21
4.2.6.	<u>Photoaffinitätsmarkierung mit 8-Azido-cAMP</u>	22
4.2.7.	<u>cAMP-Relay und cGMP-Antworten</u>	23

4.3.	<u>MONOKLONALE ANTIKÖRPER</u>	24
4.3.1.	<u>vorhandene Antikörper</u>	24
4.3.2.	<u>Immunisierung der Mäuse</u>	24
4.3.3.	<u>Fusion und Anzucht der Hybridoma</u>	25
4.3.3.1.	Vorbereiten der Zellsuspensionen für die Fusion	25
4.3.3.1.1.	Myeloma-Zellen	25
4.3.3.1.2.	Makrophagen	25
4.3.3.1.3.	Milzzellen der Maus	26
4.3.3.2.	Zellfusion	26
4.3.3.3.	Selektion der gewünschten Zelllinien	27
4.3.3.4.	Klonieren der Hybridoma-Zellen	27
4.3.3.5.	Aufzucht	28
4.3.3.6.	Konservierung der Zelllinien	28
4.3.4.	<u>Aufreinigung von IgG</u>	28
4.3.5.	<u>Immunoblots</u>	29
4.3.5.1.	jodierte Antikörper	29
4.3.5.1.1.	Immunoblots mit direkt jodierten Antikörpern	29
4.3.5.1.1.1.	Jodierungsprotokoll	29
4.3.5.1.1.2.	Immunfärbung mit ¹²⁵ J-markierten Antikörpern	30
4.3.5.1.2.	indirekte Blots mit jodierten zweiten Antikörpern	30
4.3.5.3.	Streptavidin-Biotin verstärkte Peroxidase-Färbung	30
4.3.6.	<u>Immunpräzipitation</u>	31
4.3.7.	<u>Immunfluoreszenz von Präspor-Zellen aus dissoziierten Slugs</u>	31
4.4.	<u>MUTANTENSELEKTION</u>	32
4.4.1.	<u>Mutagenese</u>	32
4.4.2.	<u>Screening nach dem Kolonieblotverfahren</u>	32
4.5.	<u>MOLEKULARBIOLOGIE</u>	33
4.5.1.	<u>verwendete DNA-Fragmente und ihre Vektoren</u>	33
4.5.2.	<u>Transformation von <i>E. coli</i></u>	35
4.5.2.1.	verwendete Stämme	35
4.5.2.2.	Transformationsprotokoll	35
4.5.3.	<u>Oligonukleotide</u>	36
4.5.4.	<u>Restriktionsenzyme und ihre Inkubationsbedingungen</u>	37

4.5.5.	<u>Präparationen</u>	
4.5.5.1.	Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> und Insertisolierung	37
4.5.5.1.2.	Promega-Präparation	37
4.5.5.1.2.	Minipräparation/Boiling-Methode	38
4.5.5.1.3..	Insertisolierung	38
4.5.5.2.	chromosomale DNA aus <i>Dictyostelium discoideum</i>	39
4.5.5.2.1.	Präparation mit CsCl-Gradienten	39
4.5.5.2.2.	DNA-Minipräparation	39
4.5.5.3.	RNA aus <i>Dictyostelium discoideum</i>	40
4.5.5.4.	Oligonukleotide	40
4.5.6.	<u>Agaroseflachbettgele und Blots</u>	41
4.5.6.1.	DNA-Gele und Southern-Blots	41
4.5.6.1.1.	Gele	41
4.5.6.1.2.	Southern-Blots	42
4.5.6.1.3.	<i>E. coli</i> -Kolonieblots	42
4.5.6.2.	RNA-Gele und Northern-Blots	42
4.5.6.2.1.	Gele	42
4.5.6.2.2.	Northern-Blots	43
4.5.6.2.3.	Kolonieblots zum Nachweis von <i>Dictyostelium</i> -RNA	43
4.5.7.	<u>Hybridisierungsproben</u>	43
4.5.7.1	Nicktranslationen	43
4.5.7.1.1.	Herstellen der Probe	43
4.5.7.1.2.	Hybridisierung	44
4.5.7.2.	Riboprobes	45
4.5.7.2.1.	Herstellen der Probe	45
4.5.7.2.2.	Hybridisierung	46
4.5.8.	<u>Vektorkonstruktionen</u>	46
4.5.8.1.	Erzeugung von Blunt-Ends	46
4.5.8.2.	Dephosphorylierung	47
4.5.8.3.	Ligation	47
4.5.9.	<u>Sequenzierung</u>	48
4.5.9.1.	Denaturieren der Doppelstrang-DNA	48
4.5.9.2.	Anhybridisieren des Primers	48
4.5.9.3.	Sequenzreaktion nach Sanger	48
4.5.9.4.	Harnstoff-Gradienten-Acrylamid-Gele	49
4.5.10.	<u>Transformation von <i>Dictyostelium discoideum</i></u>	50
4.5.10.1	Vorbereiten der Zellen	50
4.5.10.2.	Bildung des DNA-Ca ⁺⁺ -PO ₄ -Präzipitats	50
4.5.10.3.	Transformation	50
4.5.10.4.	Klonieren	51
4.6.	<u>ABKÜRZUNGSLISTE</u>	52

5.	<u>PROTEINCHARAKTERISIERUNG UND MONOKLONALE ANTIKÖRPER</u>	53
5.1.	<u>ERGEBNISSE</u>	53
5.1.1.	<u>Aufreinigung der Regulatorischen Untereinheit</u>	53
5.1.1.1.	<u>Zellmaterial</u>	53
5.1.1.2.	<u>Reinigungsschritte</u>	54
5.1.2.	<u>Fusionsergebnis</u>	55
5.1.3.	<u>Photoaffinitätsmarkierung</u>	57
5.1.3.1.	<u>Methodisches zur Photoaffinitätsmarkierung</u>	57
5.1.3.2.	<u>Identität des 40kD Proteins mit der Regulatorischen Untereinheit</u>	59
5.1.3.3.	<u>Spezifität der Antikörper für die Regulatorische Untereinheit</u>	60
5.1.4.	<u>Charakterisierung der Antikörper</u>	60
5.1.5.	<u>Keine Hinweise auf weitere cAMP-Bindeproteine</u>	64
5.1.5.1.	<u>Discoidin</u>	64
5.1.5.2.	<u>Das 48kD Protein in Fraktionen der cAMP-Affinitätssäule</u>	66
5.1.5.3.	<u>Kreuzreaktionen der Antikörper 112-4-15 und 112-315-27</u>	68
5.2.	<u>DISKUSSION</u>	70
6.	<u>MUTANTENSELEKTION UND ANALYSE</u>	73
6.1.	<u>ERGEBNISSE</u>	73
6.1.1.	<u>Die Mutante HG778</u>	73
6.1.2.	<u>cAMP-Relay und cGMP Antwort</u>	74
6.1.3.	<u>Genexpressionsanalysen</u>	76
6.1.3.1.	<u>Hybridisierungsproben</u>	77
6.1.3.2.	<u>AX2</u>	79
6.1.3.3.	<u>HG592</u>	80
6.1.3.4.	<u>HG778</u>	82
6.1.3.5.	<u>Agip53</u>	85
6.1.3.6.	<u>Zusammenfassung der Genexpressionsanalysen</u>	86
6.2.	<u>DISKUSSION</u>	88

7.	<u>DICTYOSTELIUM-TRANSFORMANTEN</u>	95
7.1.	<u>ERGEBNISSE</u>	95
7.1.1.	<u>Vektorkonstruktionen</u>	95
7.1.2.	<u>Transformationsergebnis, Kolonieblots und Western Analysen</u> ...	97
7.1.3.	<u>Reversionen</u>	99
7.1.4.	<u>Morphologische Charakterisierung der Transformanten</u>	101
7.1.5.	<u>Molekularbiologische Charakterisierung der Transformanten</u>	105
7.1.5.1.	RNA-Analysen	105
7.1.5.2.	Genomische Southern-Blots	106
7.2.	<u>DISKUSSION</u>	114
8.	<u>LITERATURLISTE</u>	123

2. EINLEITUNG

Dictyostelium discoideum ist wegen seines Lebenszyklus, währenddessen es den Übergang vom ein- zum vielzelligen Organismus vollzieht (Abb. 1), zum vieluntersuchten Objekt für Differenzierungssteuerung geworden (Loomis, 1975; 1982).

Während der vegetativen Vermehrung leben die Zellen von *Dictyostelium discoideum* als solitäre Amöben in Waldböden und ernähren sich von Bakterien. Durch Nahrungsmangel wird der Übergang zur Entwicklungs- und Differenzierungsphase induziert, die ohne weitere Zellteilungen zur Bildung von Fruchtkörpern mit Sporen und Stielzellen führt.

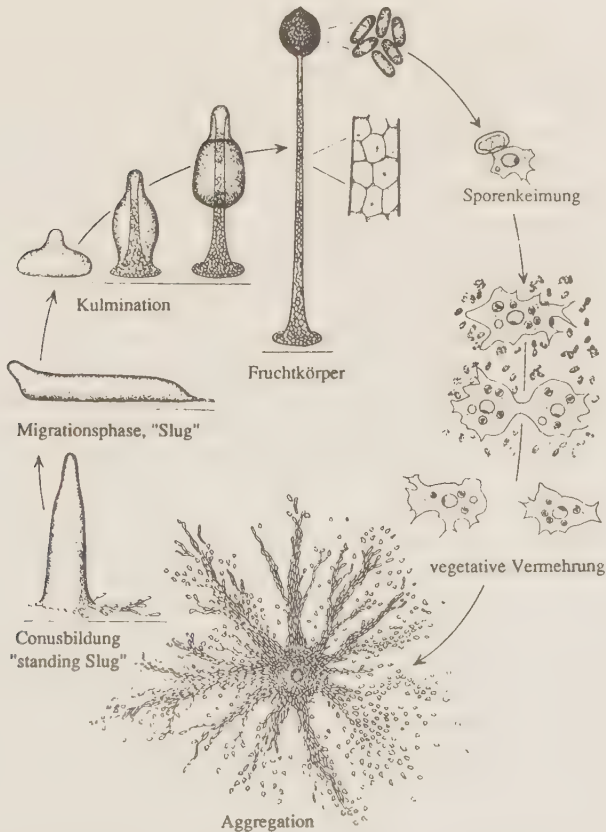


Abb. 1 : Asexueller Entwicklungszyklus von *Dictyostelium discoideum*.

Nach dem Erscheinen von cAMP-Rezeptoren auf der Zelloberfläche wird das Sammeln der Einzelzellen in "Aggregationszentren" durch die Ausbildung eines Konzentrationsgradienten von extrazellulärem cAMP (Konijn et al., 1969; Alcantara & Monk, 1984) und chemotaktische Reaktionen organisiert. Von diesem Zentrum werden oszillierende cAMP Signale abgegeben, die bei benachbarten Zellen zwei Antworten hervorrufen: die durch die intrazellulären Messenger IP_3 , Ca^{++} und cGMP vermittelte chemotaktische Bewegung zum Zentrum hin (Europe-Finner & Newell, 1985; 1986; 1987a; 1987b; Small et al., 1986) und die Weiterleitung ("Relay") des cAMP-Signals über das gesamte Aggregationsterritorium hinweg: Die Adenylatcyclase wird aktiviert, der intrazelluläre cAMP-Spiegel steigt, cAMP wird in das extrazelluläre Medium sezerniert und verstärkt dadurch den eingegangenen Reiz (Dinauer et al., 1982a). Während einer solchen Antwort werden die cAMP-Rezeptoren phosphoryliert und vorübergehend desensitiviert (Knox et al., 1986; Klein et al., 1987), die Zellen treten in eine Refraktärphase ein und adaptieren an konstante Stimuli (Dinauer et al., 1982b). Wegen der Aktivität von Phosphodiesterasen (Orlow et al., 1981) nimmt der extrazelluläre cAMP Spiegel wieder ab, die Zellen deadaptieren (Dinauer et al., 1982c) und neue Wellen entstehen. Die Periodenlänge dieser Oszillationen beträgt 5-10min. Die Aktivität dieses cAMP-Relay-Systems setzt ca. drei Stunden nach dem Beginn der Entwicklung ein und erreicht sein Maximum nach ca. fünf Stunden. In dieser Zeit beginnt das Basalniveau extra- und intra-zellulären cAMPs zu steigen, maximale Konzentrationen sind nach 14h (Tipbildung) erreicht und sinken anschließend wieder ab (Abe & Yanagishawa, 1983).

Nach der Ausbildung eines "Tips" als Organisator der Entwicklung setzt sich die Entwicklung über eine Serie morphologisch unterscheidbarer Stadien bis zur Kulmination fort (Loomis, 1975). Die Fruchtkörper bestehen aus 80% Sporen und 20% abgestorbenen Stielzellen (Raper, 1940). Diese Zelltypproportionen werden strikt eingehalten und sind nur durch wenige bekannte extrazelluläre Faktoren beeinflussbar (Maeda, 1970; Garrod & Ashworth, 1972).

Vorläuferzellen der späteren Sporen und Stielzellen sind bereits in früheren Stadien identifizierbar. Gleich nach der Ausbildung des Tips kann man Präspor-Zellen im Gewebe nachweisen (Schaap et al., 1982). In der fakultativen Wanderphase, dem Slugstadium, ordnen sich die verschiedenen Zelltypen dann in einem einfachen räumlichen Muster an: Prästiel-Zellen nehmen das vordere Fünftel des Slugs ein und bilden den Tip, die Präspor-Zellen stellen die hinteren $\frac{4}{5}$ des Slugs dar (Raper, 1940). Unter die Präspor-Zellen gestreut befinden sich ca. 10% Anterior-like Zellen (Sternfeld & David, 1982; Devine & Loomis, 1985; Blaschke et al., 1986).

Der Organisator-Charakter des Tips läßt sich anhand verschiedener Eigenschaften demonstrieren:

- (1) Die Fähigkeit des Tips, phototaktische Signale zu empfangen und die Bewegung des gesamten Slugs entsprechend zu lenken (Poff, 1973)
- (2) Die Fähigkeit des Tips, die Slugmorphologie und Wandergeschwindigkeit zu bestimmen (MacWilliams, Hoffmann, pers. Mitt.)

- (3) Die Ausbildung einer "Tipdominanz", die die Bildung sekundärer Tips in Abhängigkeit von der Entfernung vom existierenden Tip unterdrückt (Durston, 1976; MacWilliams, 1982) und wahrscheinlich durch cAMP-Oszillationen verursacht wird (Schaap, 1986; Gottmann & Weijer, 1986)
- (4) Eine mit steigender Entfernung vom Tip abnehmende Neigung der Zellen zur Tipbildung (MacWilliams, 1982)

Die Mengenverhältnisse der Vorläuferzelltypen zueinander sind auch im Slug einer strengen Regulation unterworfen. Amputationen von Slugteilen führen zur Regeneration von perfekt proportionierten Slugs und Fruchtkörpern (Raper, 1940). Dieses Phänomen belegt ebenso wie die Slugorganisation durch den Tip die Kommunikation der Zellen untereinander. Damit stellte sich die Frage, welche extrazellulären Signale die Zellen zur Regulation der Zelltyp-Proportionen benutzen.

In der Entwicklungsphase werden einige Gene reprimiert, etliche andere, für bestimmte Phasen der Entwicklung benötigte Proteine müssen neu synthetisiert und die für sie codierenden Gene in der entsprechenden Reihenfolge aktiviert werden. Eine in dieser Hinsicht besonders aktive Phase ist die Tipbildung, während der der cAMP-Spiegel sein Maximum erreicht.

Die Differenzierung der homogenen Population von Amöben in zwei oder mehr Zelltypen spiegelt sich sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene wider und es wurden in der Literatur eine Reihe von entwicklungsregulierten und z.T. zelltyp-spezifischen Transkripten beschrieben (Mehdy et al., 1983; Barklis & Lodish, 1983; Chrisholm et al., 1984). Diese Klone wurden als Marker benutzt, um unter definierten Kultur-Bedingungen Faktoren zu charakterisieren, die als Kommunikations-Signale bei der Differenzierungssteuerung dienen (Kopachik et al., 1985; Oyama & Blumberg, 1986; Kimmel, 1987; Berks & Kay, 1988). Durch solche Untersuchungen wurde ein Stielzell-induzierendes Morphogen namens DIF (Differentiation Inducing Factor) identifiziert (Morris et al., 1987; Williams et al., 1987). Es zeigte sich, daß extrazelluläres cAMP nicht nur für die Chemotaxis von Bedeutung ist, sondern auch in die Genregulation eingreift. Man kann differenzierende Zellen durch Zugabe von extrazellulärem cAMP dazu veranlassen, ihre Genexpressionsmuster zu verändern.

In postaggregativen Stadien sind bestimmte zelltypspezifische Gene exprimiert. Nach Dissoziation der Aggregate werden die Transkripte dieser Gene wieder abgebaut, der Effekt der Vereinzelung der Zellen kann jedoch durch extrazelluläres cAMP verhindert werden (Mehdy et al., 1983). Präspor-spezifische mRNAs reagieren sehr sensitiv auf solche Behandlung, man kann vollständige Induktion oder Repression erreichen. Daher wird cAMP als wesentlicher Faktor der Präspor-Regulation angesehen.

Prästiel-spezifische RNAs antworten weit weniger empfindlich auf Dissoziation der Zellen und extrazelluläres cAMP. Da aber gezeigt werden konnte, daß auch die Prästiel-Genexpression cAMP-abhängig ist, entstanden Widersprüche. Die Kontroverse um die Effekte von cAMP auf die Prästiel-Regulation erhielt eine Lösung als gezeigt werden konnte, daß die Prästiel-Induktion in zwei Phasen unterteilt werden muß: in eine erste

cAMP-abhängige Periode und eine zweite DIF-abhängige Phase (Kwong et al., 1988; Berks & Kay, 1988). Während dieser zweiten Phase wurden inhibierende Effekte von cAMP auf die Stielzelldifferenzierung nachgewiesen (Berks & Kay, 1988).

Die verfügbaren Daten der Zelltypdifferenzierung bei *Dictyostelium discoideum* wurden zu Modellen zusammengefaßt, in denen negative Feedbackloops die Zelltyp-Proportionen regeln (MacWilliams et al., 1985) und die die räumliche Anordnung der Zelltypen durch räumliche Gradienten von Aktivatoren und Inhibitoren erklären (Meinhardt, 1983). Die Modelle gehen von einer antagonistischen Wirkung von DIF und cAMP aus, wobei DIF die (Prä)Stiel-Differenzierung induziert und cAMP die Zellen zur (Prä)Sporen-Entwicklung veranlaßt. Neben cAMP und DIF konnten noch Regulationsaktivität von NH_3 , Adenosin (Abb. 2) und anderen, in ihrer molekularen Struktur noch nicht charakterisierten Differenzierungs-Faktoren ("PIF", "SPIF", "CMF") nachgewiesen werden (Williams, 1988).

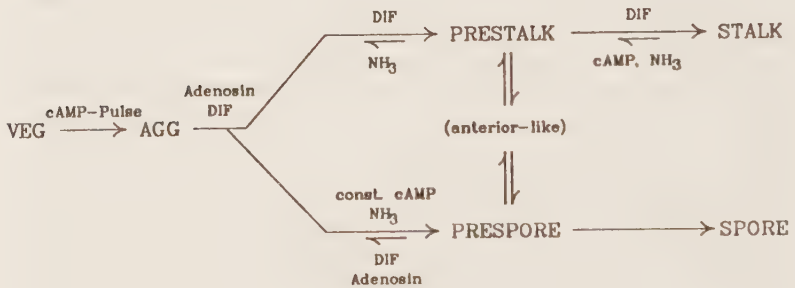


Abb. 2:

Zusammenfassung der Wirkungen extrazellulärer Faktoren in der Differenzierungssteuerung von *Dictyostelium discoideum* (modifiziert nach Williams, 1988)

Neben der Charakterisierung der extrazellulären Signale der Entwicklungsregulation ist auch die Aufklärung der intrazellulären Signaltransduktion von Interesse.

Für manche Geninduktionsprozesse müssen sehr hohe Konzentrationen an extrazellulärem cAMP (100 μM bis mM) eingesetzt werden, wohingegen der membranständige cAMP-Rezeptor schon bei Stimulation mit 5nM cAMP halbmaximale Chemotaxis-Antworten hervorruft (Theibert et al., 1986). Wegen dieser Diskrepanz wurde vermutet, daß bei millimolaren Dosen das cAMP in die Zellen diffundieren kann und sein Wirkungsort im Cytoplasma liegt, d.h. daß intrazelluläres cAMP second-

messenger Funktion ausübt (Schaller et al., 1984). Ein aussichtsreicher Kandidat als Vermittler in einer solchen Signaltransduktion ist die cAMP-abhängige Protein Kinase ("cAdPK"; de Gunzburg et al., 1982; Leichtling et al., 1982).

Die Regulatorische Untereinheit (R) der cAdPK stellt das dominante cytoplasmatische cAMP-Bindeprotein in *Dictyostelium discoideum* dar (Leichtling et al., 1981; 1982; 1984; Majerfeldt et al., 1984). Obwohl das Protein starke Homologien zu Säuger R-Untereinheiten aufweist, sind einige Unterschiede bemerkenswert. Im Säuger-Protein, das als Tetramer der Zusammensetzung R_2C_2 vorliegt, wird die Katalytische Untereinheit (C) nach Bindung von 4 Molekülen cAMP aktiviert durch Dissoziation in ein $R(2cAMP)$ -Dimer und zwei C (Flockhard & Corbin, 1982). In *Dictyostelium* kann die Regulatorische Untereinheit nicht als Dimer vorliegen, da der N-Terminale Bereich, der für diese Interaktion verantwortlich ist, im *Dictyostelium*-Protein fehlt (Mutzel et al., 1987). Obwohl beide cAMP-bindenden Domänen bei *Dictyostelium* in der DNA-Sequenz vorhanden sind (Mutzel et al., 1987), ist nur eine hochaffine Bindungsstelle aktiv, die zweite ist entweder inaktiv oder weist eine stark reduzierte Affinität auf (de Gunzburg et al., 1982). Dadurch ergibt sich folgendes Aktivierungsschema:



Das *Dictyostelium*-Protein ist entwicklungsreguliert, es wird in späten Entwicklungsstadien ca. fünf- bis zehnfach verstärkt exprimiert (Leichtling et al., 1984; Woffendin et al., 1986; Vaughan & Rutherford, 1987). Im Slugstadium weist die cAdPK eine deutliche Zelltyppräferenz auf (Schaller et al., 1984): man findet in Präspor-Zellen die fünffache Aktivität verglichen mit Prästiel-Zellen. Die Katalytische und Regulatorische Untereinheit sind koreguliert; sie liegen immer in einem konstanten molaren Verhältnis vor (Leichtling et al., 1984). Beide Untereinheiten werden während der Entwicklung vermehrt im Zellkern gefunden, wo auch Substrate des Enzyms identifiziert werden konnten (Frame & Rutherford, 1984; Chambers et al., 1987). Alle diese Befunde kann man als indirekte Hinweise für eine Bedeutung von intrazellulärem cAMP in der Präspor-Differenzierung ansehen.

Da sich die cAMP-Bindung der S-Adenosyl-Homocystein-Hydrolase als in vivo irrelevante Reaktion herausgestellt hat (de Gunzburg et al., 1983; Guitton et al., 1987), ist das 36/40kD Heterodimer CABP-1 als einziges weiteres cAMP-Bindeprotein in *Dictyostelium* beschrieben. Obwohl die Regulatorische Untereinheit und die 40kD Untereinheit von CABP-1 gleiches Molekulargewicht aufweisen, sind ihre isoelektrischen Punkte und antigenen Eigenschaften verschieden. Der unterschiedliche pI ist nicht auf Modifikationen zurückzuführen, da die Unterschiede schon nach in vitro Transkription und anschließender Immunpräzipitation nachweisbar waren (Tsang & Tasaka, 1986; Tsang et al., 1987). CABP-1 wurde aus Cytoplasmafraktionen aufgereinigt, doch war ein beträchtlicher Teil während der Entwicklung auch auf der Zelloberfläche nachweisbar.

CABP-1 wurde wie die Regulatorische Untereinheit während der Entwicklung vermehrt im Kern gefunden (Kay et al., 1987).

Es wurden eine Reihe von Versuchen durchgeführt, die sich die unterschiedlichen Affinitäten für cAMP-Analoga von Rezeptor und Regulatorischer Untereinheit zunutze machten, um zwischen Effekten beider Proteine unterscheiden zu können.

Rezeptor:	2'd-cAMP: 0.27µM	8-Br-cAMP: 16µM
Regulatorische Untereinheit:	2'd-cAMP: 385µM	8-Br-cAMP: 0.053µM

Die Ergebnisse zeigten deutlich, daß in den meisten Fällen die Wirkung von extrazellulärem cAMP über den Rezeptor vermittelt wird (Schaap & van Driel, 1985; Gomer et al., 1986; Haribabu & Dottin, 1986; Oyama & Blumberg, 1986; Kimmel, 1987). Es mehren sich jedoch die Hinweise, daß zusätzlich zu der unbestritten wichtigen Rolle des extrazellulären cAMP auch intrazelluläres cAMP Funktionen in der Differenzierungssteuerung ausübt.

- (1) Kimmel (1987) fand, daß die Repression eines cAMP-sensitiven Gens auch in Gegenwart von extrazellulärem cAMP nicht stattfindet, wenn man den intrazellulären cAMP-Anstieg durch Ausschalten der Adenylatcyclase hemmt.
- (2) Nach der Dissoziation von späten Aggregaten konnten Oyama & Blumberg (1986) deutliche Effekte von 8-Br-cAMP, dem R-spezifischen Analogon, auf die Reinduktion des Präspor-spezifischen Gens PL3 nachweisen.
- (3) 8-Br-cAMP konnte cAMP in der cAMP abhängigen Phase der Prästiel-Induktion ersetzen (Kwong et al., 1988).
- (4) Mit 8-Br-cAMP kann man Zellen induzieren, quantitativ in Sporen auszdifferenzieren unter *in-vitro*-Bedingungen, in denen cAMP selbst keinen Effekt hat (Kay, pers. Mitt.)

Die Problemstellung dieser Doktorarbeit war es, Funktionen der cAMP abhängigen Proteinkinase, bzw. ihrer Regulatorischen Untereinheit zu charakterisieren. Dazu wurde nicht der Weg beschritten, durch extrazelluläre Faktoren intrazelluläre Differenzierungs-Vorgänge zu beeinflussen, sondern es war das Ziel dieser Arbeit, die Regulatorische Untereinheit durch Mutationen auszuschalten und von beobachteten Defekten auf Funktionen der Proteinkinase zu schließen.

Wegen seines haploiden Lebenszyklus ist *Dictyostelium discoideum* für solche Mutantenanalysen gut geeignet, das Screenen nach spezifischen Defektmutationen wurde bereits erfolgreich durchgeführt (Noegel et al., 1985; Wallraff et al., 1986).

Durch das Ausschalten der Regulatorischen Untereinheit sollten die Mutanten nicht die Aktivität der cAdPK verlieren, sondern nur ihre Abhängigkeit von intrazellulärem cAMP. Da die Katalytische Untereinheit ohne die Inhibition durch die Regulatorische Untereinheit konstitutiv aktiv ist, sollten sich Funktionen der cAdPK durch Überaktivität cAMP-regulierter Prozesse zeigen.

3. ZUSAMMENFASSUNG

Die Regulatorische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase von *Dictyostelium discoideum* wurde nach Protokollen aus der Literatur präparativ aufgereinigt. Dieses Material wurde zum Immunisieren von Mäusen verwendet, aus denen fünf hochspezifische monoklonale Antikörper gegen verschiedene Epitope der Regulatorischen Untereinheit isoliert werden konnten, die für Immunoblots und Immunpräzipitationen verwendet werden können. Die Identität des Antigens, das diese Antikörper erkennen, mit der Regulatorischen Untereinheit wurde über dessen pI und seine Ligandenaffinität für cAMP und cGMP bewiesen.

Zwei funktionelle Tests auf cAMP-Bindung wurden verwendet, um weitere cAMP-Bindeproteine zu suchen: die Bindung an eine cAMP-Affinitätssäule und die Photoaffinitätsmarkierung mit 8-Azido-cAMP. Es wurden jedoch keine Hinweise auf weitere cAMP-Bindeprotein gefunden. Auch Kreuzreaktionen von monoklonalen Antikörpern waren nicht korrelierbar mit einer cAMP-Bindeaktivität. Die Regulatorische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase war das einzige nachweisbare cAMP-Bindeprotein und stellt somit einen aussichtsreichen Kandidaten als Vermittler in einer Signaltransduktionskette von intrazellulärem cAMP in der Steuerung der Entwicklung von *Dictyostelium discoideum* dar.

Die monoklonalen Antikörper wurden benutzt, um Defektmutanten der Regulatorischen Untereinheit zu suchen. Eine Mutante (HG778) mit reduzierter Menge des Proteins konnte gefunden werden. Diese Mutante weist außerdem eine stark reduzierte cGMP-Antwort und abnorme Entwicklungsregulation auf. Durch den Vergleich der Genregulation dieser Mutante mit einer Mutante deren Adenylatcyclase durch extrazelluläre cAMP-Pulse nicht aktiviert werden kann (Agip53), konnte ein cDNA-Klon charakterisiert werden (A11B6), der wahrscheinlich durch intrazelluläres cAMP reguliert wird. Dieser Klon ist in der Mutante Agip53, die wegen des Adenylatcyclasedefekts keine intrazellulären cAMP-Oszillationen ausführen kann, nicht induzierbar. In der Mutante HG778 dagegen, die wegen der Reduktion der Regulatorischen Untereinheit eine konstitutiv aktivierte Kinase aufweisen sollte, ist der Klon cAMP- und Entwicklungs-unabhängig voll exprimiert.

Für alle anderen in dieser Untersuchung benutzten cDNA-Klone sind die Expressionsmuster in diesen beiden Mutanten nicht mit einer Regulation durch intrazelluläres cAMP vereinbar. Es existiert also mindestens noch eine weitere Signaltransduktionskette, die möglicherweise mit der die Chemotaxis vermittelnden $IP_3 \rightarrow Ca^{++} \rightarrow cGMP$ -Kaskade identisch ist. Da die Mutante HG778 eine reduzierte cGMP-Antwort aufweist, ist sie auch in dieser Signaltransduktion defekt. Ein kausaler Zusammenhang zwischen diesen beiden Eigenschaften der Mutante HG778 konnte jedoch nicht bewiesen werden.

Deshalb wurden Transformationen mit einem integrierenden Vektor vorgenommen, der zu Gendisruption führen kann und auch die Produktion von antisense-RNA ermöglicht. Transformanten mit reduzierter Menge an Regulatorischer Untereinheit konnten isoliert

werden. Die Anwesenheit von Wildtyp-Protein, Wildtyp-RNA und Wildtyp-Fragmenten in genomischen Southernblots widerlegen einen Gendisruptionsmechanismus für die Inaktivierung der Regulatorischen Untereinheit. Reversionen zum Wildtyp-Phänotyp, die mit einem Wiedererscheinen des Proteins und dem Verlust der antisense-RNA gekoppelt sind, sind ein starker Hinweis auf antisense-Effekte in den Transformanten.

Die Transformanten weisen starke Defekte in der Zelldifferenzierung im Slugstadium und im Fruchtkörper auf. Der Anteil der (Prä)Stiel-Zellen ist in den Transformanten um die Hälfte reduziert, dies entspricht etwa der Reduktion der Proteinmenge der Regulatorischen Untereinheit.

Dies ist einer der wenigen direkten Hinweise für eine Beteiligung von intrazellulärem cAMP und der cAMP-abhängigen Proteinkinase in der Entwicklungssteuerung von *Dictyostelium discoideum*, besonders der Regulation der Zelldifferenzierung. Die Änderung der Zelltypproportionen steht in Einklang mit Hypothesen zur Regulation der Zelldifferenzierung durch extrazelluläres cAMP (Sporen-induzierend) und DIF (Stielzell-induzierend) in *Dictyostelium discoideum* unter der Annahme, daß (1) intrazelluläres cAMP der second messenger von extrazellulärem cAMP ist und (2) wegen der Reduktion der Regulatorischen Untereinheit der cAdPK die Katalytische Untereinheit unabhängig von aktuellen cAMP-Konzentrationen aktiv ist und ein hohes Aktivierungsniveau für die Spordifferenzierung hervorruft.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1. DICTYOSTELIUM ZELLKULTUR

4.1.1. verwendete Stämme

- AX2: AX2 wurde aus dem Freilandisolat NC4 gewonnen. Er unterscheidet sich von NC4 durch zwei Mutationen, die axenisches Wachstum ermöglichen (Ashworth & Watts, 1970). AX2 (Klon 214) ist der Ursprungsstamm der anderen Mutanten.
- Agip 53: Mutante von AX2, deren Adenylatcyclase nicht über die Basalaktivität hinaus aktiviert wird (Darmon et al., 1977; Wurster & Bumann, 1981).
- HG 302: Mutante von AX2, die gegen Entwicklungsinhibition durch cAMPS, ein nicht hydrolysierbares cAMP Analogon, resistent ist (Gerisch et al., 1985).
- HG 592: Mutante von HG 302, die bereits im Wachstumsmedium entwicklungs-regulierte Gene exprimiert, d.h. bei der im Wildtyp nötige Induktionsprozesse umgangen werden können (Gerisch et al., 1985).

4.1.2. Anzucht in Suspension

4.1.2.1. Schüttelkulturen

Der Laborstamm AX2 und seine Derivate können im Gegensatz zu Freilandisolaten axenisch gezogen werden. Dazu werden jede Woche 30ml AX-Medium (Ashworth & Watts, 1970) mit eingefrorenen AX2-Sporen beimpft und die Kultur bis zu einer Dichte von 5×10^6 Zellen/ml hochgezogen. Diese Vorkultur kann 1-2 Wochen bei 4°C unter Schütteln aufbewahrt und zum Animpfen von Hauptkulturen verwendet werden.

Kulturen bis zu 2l werden bei 21°C auf Schüttlern bei 150rpm gezogen. Man erntet exponentiell wachsende Zellen (bis 5×10^6 Zellen/ml) durch Abzentrifugieren mit 1500rpm in einer Kühlzentrifuge bei 4°C und zweimaliges Waschen mit kaltem Phosphatpuffer (17 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6.0).

AX-Medium:	1.43	%	Oxoid-Pepton
	0.715	%	Hefeextrakt
	1.8	%	Maltose
	18.0	mM	Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ pH 6.7

4.1.2.2. Fermenter

Es stand ein New Brunswick Scientific Fermenter Drive für drei 10l-Fermenter zur Verfügung. Man beimpft je 10l Medium mit 900ml einer Kultur von 5×10^6 Zellen/ml. Das Medium wird mit 200rpm gerührt und mit 4l/min belüftet. Nach zwei Tagen ist wieder eine Dichte von 5×10^6 Zellen/ml erreicht. Die Kulturen wurden mit einer auf 2000rpm reduzierten Durchflußzentrifuge (Padberg, CEPA 41G) geerntet.

4.1.3. Anzucht auf Agarplatten

4.1.3.1. Normalagarplatten mit *E. coli* B/2

Zum Beurteilen der Koloniemorphologie werden *Dictyostelium*-Zellen auf Normal-Agar angezogen. Dazu spatelt man ca. 0.2ml einer dichten *E. coli* B/2 Suspension aus (Übernachtkultur in Standard I-Nährbouillon von Merck, 7882), läßt die Platten trocknen und impft mit einer Öse oder mit Zahnstochern punktförmig die *Dictyostelium*-Zellen an.

NA-Agar:	2.0	%	Difco-Bacto-Agar
	0.1	%	Pepton
	0.1	%	Glucose
	17.0	mM	Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , pH 6.7

4.1.3.2. SM-Agarplatten mit *Klebsiella aerogenes*

Für Massenplatten, Kolonieblots oder zum Klonieren (4.4.) wurde vorwiegend SM-Agar verwendet. Massenplatten werden angesetzt, indem man 0.2ml einer dichten *Klebsiella*-Suspension zusammen mit 1×10^5 *Dictyostelium*-Zellen oder Sporen auf SM-Agar ausspatelt, die Platten trocknen läßt und ca. 2 Tage bei 21°C inkubiert. Bevor der Bakterienrasen aufgebraucht ist, schwemmt man die Zellen mit Phosphatpuffer von den Massenplatten ab und wäscht sie durch wiederholte differentielle Zentrifugation bei 4°C mit 1500rpm bakterienfrei.

SM-Agar:	1.0	%	Bactopepton
	0.1	%	Hefeextrakt
	1.0	%	Glucose
	0.1	%	MgSO ₄
	17.0	mM	Kaliumphosphatpuffer, pH 6.5
	1.5	%	Agar

4.1.4. Entwicklungsinduktion

4.1.4.1. Filterentwicklung

Die normale Morphogenese der *Dictyostelium*-Entwicklung kann man induzieren, indem man hungernde Zellen auf Filter aufträgt. Dazu legt man zwei Filtersupports (Gelman Filtration Products, Durchmesser 4.5cm) in kleine Petrischalen (Durchmesser 4.7cm) und tränkt sie mit LPS-Puffer. Die überschüssige Lösung pipettiert man wieder ab und legt auf das Filterkissen einen trockenen Filter (Whatman 50, hardened, Durchmesser 4.25 cm). Darauf verteilt man gleichmäßig 0.5ml einer Suspension mit 7×10^7 Zellen, so daß sich eine Dichte von 5×10^6 Zellen/cm² einstellt. Die Petrischalen werden in einer

feuchten Kammer bei 21°C inkubiert. Um optimale Synchronität der Entwicklung zu erreichen, tauscht man in regelmäßigen Abständen (alle 6h) die unteren Filtersupports aus.

LPS:	40.0	mM	Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , pH 6.4
	20.0	mM	KCl
	0.24	mM	MgCl ₂

4.1.4.2. Suspensionsentwicklung

In Suspension finden Entwicklungsprozesse ohne Morphogenese statt, die sich über die Expression entwicklungsregulierter Proteine und zellbiologische Eigenschaften nachweisen lassen. Unter den laborüblichen Bedingungen erreichen die Zellen Aggregationskompetenz, sind jedoch in der Weiterentwicklung behindert.

Die medium- bzw. bakterienfrei gewaschenen kalten Zellen werden auf eine Dichte von 1×10^7 Zellen/ml in Phosphatpuffer eingestellt und bei 21°C und 150rpm geschüttelt. Dieser Zeitpunkt der Aufwärmens gilt als Beginn der Entwicklung: t_0 . Zur Stimulierung der Entwicklung kann man solche Kulturen "pulsen", indem man mit einer Infusionspumpe (z.B. Braun, Perfusor VI) alle 6-8 min eine cAMP-Lösung zutropfen läßt, die die gesamte Kultur vorübergehend auf eine cAMP Konzentration von 5×10^{-8} M bringt.

4.1.5. Konservierung der Stämme

4.1.5.1. Sporen

Sporen kann man entweder in Phosphatpuffer schockgefrieren und in flüssigem Stickstoff aufbewahren oder lyophilisieren. Dazu werden die Sporen in dreimal pasteurisierter fettarmer Milch aufgenommen, schockgefroren, lyophilisiert, die Ampullen unter Vakuum abgeschmolzen und im Kühlraum aufbewahrt.

4.1.5.2. Amöben

Stämme, die nicht oder nur schlecht sporulieren, werden als vegetative Amöben eingefroren. Man zentrifugiert exponentiell wachsende Zellen ab und nimmt das Pellet in eiskaltem Einfriermedium auf, so daß sich eine Dichte von 5×10^6 Zellen/ml einstellt. Die Ampullen mit je 0.5ml Zellsuspension werden in den Einfrierköpfen von Stickstofftanks für 3h um 1°C/min abgekühlt und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Einfriermedium:			AX-Medium
	100	U/ml	Penicillin/Streptomycin (GIBCO 043-5140)
	5	%	DMSO (Serva 20385)

4.2. PROTEINCHARAKTERISIERUNG

4.2.1. SDS-PAGE und Western-Blots

Für die diskontinuierliche SDS-PAGE (Lämmli, 1970) wurden standardmäßig 10%-ige Trenngele (10x13cm bei 1mm Schichtdicke) mit 3%-igen Sammelgelen verwendet. Pro Spur wurden, wenn nicht anders angegeben, 10µg Protein oder Lysate von 1×10^6 Zellen (=100µg Protein) in Probenpuffer geladen. Die Auftrennung der Proteine erfolgt dann bei 40mA.

Das Gel kann direkt gefärbt werden (4.2.3.) oder für den Immunnachweis in einer gekühlten Blotkammer mit 1A auf Nitrocellulose (Schleicher und Schüll, BA85 Membrane Filters, 0.45µm, 401196) transferiert werden (Towbin et al., 1979).

Trenngel:	8.3	ml	Acrylamid 30%
	5.0	ml	4x Trenngel-Puffer
	11.6	ml	H ₂ O
	5.0	µl	TEMED
	80.0	µl	10% APS
Sammelgel:	1.0	ml	Acrylamid 30%
	2.5	ml	4x Sammelgel-Puffer
	7.4	ml	H ₂ O
	5.0	µl	TEMED
	40.0	µl	10% APS
Acrylamid-Stammlösung:	30.0	%	Acrylamid
	0.8	%	Bisacrylamid
4x Trenngel-Puffer:	1.5	M	Tris/HCl, pH 8.8
	0.4	%	SDS
4x Sammelgel-Puffer:	0.5	M	Tris/HCl, pH 6.8
	0.4	%	SDS
Laufpuffer:	1.442	%	Glycin
	0.1	%	SDS
	25.0	mM	Tris
3x Probenpuffer:	65.0	mM	Tris/HCl, pH 6.8
	5.0	%	β-Mercaptoethanol
	2.3	%	SDS
	10.0	%	Glycerin
Transferpuffer:	1.442	%	Glycin
	25.0	mM	Tris
	20.0	%	Methanol

4.2.2. Isoelektrische Fokussierung, 2D-Gele (O'Farrell 1975)

Die isoelektrische Fokussierung wird in 13cm hohen Glasröhrchen mit 3mm Innendurchmesser durchgeführt. Für acht Röhrchen setzt man 10ml Lösung an:

2.0	ml	H ₂ O bidest.		
5.5	g	Harnstoff	→	9.5 M
1.33	ml	Acrylamid (A)	→	4.0 %
2.0	ml	NP 40 (B)	→	2.0 %
0.5	ml	Ampholine, pH 3-11	→	5.0 %
10.0	µl	TEMED	→	0.1 %
13.0	µl	Ammoniumperoxodisulfat 10%	→	0.13 %

Die Röhrchen werden unten mit Parafilm verschlossen und 10cm hoch mit dem Polymerisationsgemisch gefüllt. Dieses wird mit 10µl Wasser überschichtet. Nach einer Polymerisationszeit von 2h entfernt man für die Vorfokussierung das Wasser vorsichtig mit einer Nadel und überschichtet das Gel nacheinander mit 20µl Lysispuffer (C), 30µl Ampholinen (D) und füllt die Röhrchen mit Anodenpuffer (E). Nach dem Befestigen der Röhrchen füllt man die Oberkammer mit Anodenpuffer (E), die Unterkammer mit Kathodenpuffer (F) für den Vorlauf:

15 min bei 200V
 30 min bei 300V
 > 60 min bei 400V

Für den Hauptlauf entfernt man den Lysispuffer und die Ampholine mit einer Nadel und wäscht das Gel mehrere Male mit Wasser. Dann trägt man die Probe in 20-30µl Lysispuffer auf, überschichtet wieder mit Ampholinen und Anodenpuffer. Die Fokussierung wird dann bei 400V über Nacht (ca. 18h) durchgeführt. Danach entfernt man die Gele aus den Glasröhrchen und äquilibriert sie für 20min in SDS-PAGE Probenpuffer (siehe 4.2.1.). Man kann die fertigen Fokussiergele in Probenpuffer einfrieren oder sofort in der zweiten Dimension (4.2.1) auftrennen. Dazu werden die Röhrchengele mit 1% Agarose in SDS-PAGE-Probenpuffer auf dem Sammelgel befestigt, der elektrophoretisch aufgetrennt und transferiert.

(A) Acrylamid: 28.38 % Acrylamid
 1.62 % Bisacrylamid

(B) NP 40: 10.0 % in H₂O bidest.

(C) Lysispuffer: 9.5 M Harnstoff
 2.0 % NP 40
 5.0 % β-Mercaptoethanol
 2.0 % Ampholine : 0.4 % pH 4-6
 0.4 % pH 5-7
 0.2 % pH 2-11

(D) Ampholine:	6.0	M	Harnstoff
	0.4	%	Ampholine pH 4-6
	0.2	%	Ampholine pH 2-11

(E) Anodenpuffer:	10.0	mM	H ₃ PO ₄
-------------------	------	----	--------------------------------

(F) Kathodenpuffer:	20.0	mM	NaOH
---------------------	------	----	------

4.2.3. Gesamtproteinfärbung von Gelen

4.2.3.1. Coomassiefärbung

10-30 min schütteln in Färbelösung:	0.25	%	Coomassie-blue R
	25.0	%	Isopropanol
	7.0	%	Essigsäure

über Nacht extrahieren in Entfärber:	5.0	%	Methanol
	7.0	%	Essigsäure

4.2.3.2. Silberfärbung

Nach der SDS-PAGE muß man die Gele:

a) fixieren:	1x	30min	50.0	%	Methanol
			12.0	%	Essigsäure
b) waschen:	3-4x	10min			H ₂ O dest.
c) fixieren:	1x	15min	50	mM	Na ₂ HB ₄ O ₇
			4	%	Glutaraldehyd
d) waschen:	3x	2min			H ₂ O dest.
e) Silber-imprägnieren:	1x	1 min	50	mM	AgNO ₃
			18.4	mM	NaOH
			0.49	%	NH ₃
f) waschen:	1x	15min			H ₂ O dest.
g) Silberreduktion:	1x	ad lib.	10.0	%	Methanol
			0.6	mg/ml	Zitronensäure
			0.15	%	Formaldehyd

Falls die Färbung zu dunkel geworden ist, kann man die Gele wieder aufhellen mit Kodak-Reducer (0.2% Na₂S₂O₃, 0.01% K₃(Fe(CN)₆)).

4.2.4. Molekulargewichtsstandards

Molekulargewichtsstandards (low molecular weight von Pharmacia, 17-0446-01 und high molecular weight von Biorad, 161-1313) werden zur Detektion auf Autoradiogrammen mit ^{14}C -Formaldehyd markiert (Dottaviomartin & Ravel, 1978):

50 μl	^{14}C -Formaldehyd (NEN, NEC 039H, 50mCi/mmol, 1mCi/ml)
250 μl	Proteinstandard (1mg/ml) in 40mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0
100 μl	NaBH_3CN (6mg/ml)

werden gemischt und 24h auf Eis inkubiert. Danach fällt man die Proteine mit 800 μl Ethanol aus, zentrifugiert und löst das Pellet in SDS-Probenpuffer durch 3min Kochen.

4.2.5. Aufreinigung der Regulatorischen Untereinheit

4.2.5.1. cAMP-Bindungsassay

Pro Testansatz mischt man auf Eis in 3ml Einmalreagenzgläsern:

Gesamtbindung:	50 μl	5x Testlösung
	125 μl	H_2O
	25 μl	^3H -cAMP-Lösung (100nM, ca. $1 \times 10^5\text{cpm}$, 3,5 μl NEN, NET 275, verdünnt in 600 μl H_2O)
	50 μl	Säulenfraktionen
unspezifische Bindung:	50 μl	5x Testlösung
	100 μl	H_2O
	25 μl	cAMP (1mM)
	25 μl	^3H -cAMP-Lösung (wie oben)
	50 μl	Säulenfraktionen

Zusätzlich zu den Fraktionen der DEAE-Säule mißt man einen Leerwert (Ansatz wie oben ohne Protein). Nach 15min Inkubation gibt man 1ml eiskalten Waschpuffer zu und saugt die Testansätze mit Wasserstrahlvakuum durch Membranfilter (Millipore, HAWP 02500, 0.45mm Porengröße). Die Filter und die darauf gebundenen Proteine werden noch dreimal gewaschen, indem man je 3ml Waschpuffer durchsaugt. Die Filter werden mit 4ml Scintillationsflüssigkeit versetzt und im β -Counter gezählt. Zum Kalibrieren zählt man außerdem die Gesamtmenge des eingesetzten ^3H -cAMP.

5x Testlösung:	250.0 mM	NaAcetat pH 5.5
	2.5 mM	EDTA
	25.0 mM	Benzamidin
	10.0 M	DTT
	0.5 %	BSA

Waschpuffer: 20.0 mM Natriumacetat pH 5.5
1.0 mM EDTA

4.2.5.2. Aufreinigungsprotokoll

Mengenangaben gelten für drei Fermenter; weniger Zellmaterial wird bis zur cAMP-Affinitätssäule in entsprechend geringeren Volumina aufgereinigt. Alle Prozeduren werden im Kaltraum oder auf Eis ausgeführt.

300-500 g AX2-Zellen (Naßgewicht), die sich 12-14h in Suspension entwickelt haben, werden abzentrifugiert, mit Phosphatpuffer gewaschen und in 2-3 Pelletvolumina eiskaltem Lysispuffer (ca. 1l) resuspendiert. Die Zellen werden in einer vorgekühlten Parrbombe (US Gauge) 10min an einen Stickstoffdruck von 500PSI angepaßt und durch plötzlichen Druckabfall lysiert. Das Zellhomogenat wird 20min bei 10000g zentrifugiert, unlösliche Bestandteile verworfen und der Überstand 3h bei 100000g erneut abzentrifugiert. Der pH-Wert des nun klaren Überstandes wird kontrolliert und wenn nötig auf 7.2 nachgestellt. Nun gibt man im Batch-Verfahren 200g mit DE-Säulenpuffer äquilibriertes DEAE 52 (Whatman) zu, rührt vorsichtig für $1\frac{1}{2}$ h und füllt die Suspension in eine Säule (Durchmesser 6cm, Höhe 60cm), in die man vorher ein ca. 5cm hohes Säulenbett an unbeladenem DEAE-52 (pH 7.2) eingefüllt hat. Nachdem sich das Säulenmaterial gesetzt hat (Laufgeschwindigkeit 1ml/min) und das nicht gebundene Material über die Säule gelaufen ist, spült man mit 2 Säulenvolumina DE-Säulenpuffer. Anschließend eluiert man das gebundene Material mit 1.5l NaCl-Gradient (5-500mM) und sammelt 15ml-Fractionen. Die cAMP-Bindeaktivität (4.2.4.1.) eluiert zwischen 30 und 150mM NaCl.

Die Fractionen werden gepoolt und auf eine cAMP-Affinitätssäule von ca. 5ml Feuchtvolumen geladen (Agarose-Hexane-Adenosine 3',5'-cyclic Phosphate, AGCAMP™ TYPE 3, 5501, von P-L Biochemicals, Milwaukee, Wis. 5320). Nach dem Auftragen wäscht man die Säule mit 10ml cAMP-Säulenpuffer (A), 70ml 0.5M NaCl in (A), 10ml (A) und läßt am Ende ein Säulenvolumen 1mM cAMP in (A) auf die Säule. Während der Inkubation über Nacht dissoziieren cAMP-Bindeproteine vom Säulenmaterial und können mit 15ml 1mM cAMP in (A) eluiert werden. Die Reinheit der Fractionen wird mit SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung überprüft, die Ausbeute beträgt ca. 300µg Protein aus 400g Zellen.

Lysispuffer:	10	mM	MOPS, pH 7.2
	20	%	Saccharose
	5	mM	NaCl
	2	mM	EDTA
	4	mM	B-Mercaptoethanol
	5	mM	Benzamidin

DE Säulenpuffer:	5	mM	MOPS, pH 7.2
	10	%	Glycerin
	5	mM	NaCl
	1	mM	EDTA
	2	mM	β -Mercaptoethanol
	5	mM	Benzamidin

cAMP-Säulenpuffer (A):	5	mM	MOPS, pH 7,0
	10	%	Glycerin
	25	mM	NaCl
	0.1	mM	EDTA
	2	mM	β -Mercaptoethanol
	5	mM	Benzamidin

4.2.6. Photoaffinitätsmarkierung mit 8-Azido-cAMP

Für die Photoaffinitätsmarkierung (Leichtling et al., 1984) wurden sowohl angereicherte DEAE-Säulenfraktionen (4.2.4.) als auch gesamtcytoplasmatische Proteine verwendet. Um Kompetition des Labels mit endogenen Nukleotiden zu vermeiden, wurde die Cytoplasmafraktion (100000g Überstand von Zellhomogenaten, 4.2.4.) von niedermolekularen Bestandteilen durch Chomatographie über eine mit DE-Säulenpuffer äquilibrierte Sephadex G-50 Säule (Pharmacia, fine) befreit. Der Proteinpeak im Eluat der Säule wurde über die OD₂₈₀ bestimmt, alle Fraktionen gepoolt und für den Photoaffinitätslabel eingesetzt.

Die einzelnen Testansätze (50 μ l Gesamtvolumen) wurden im Dunkeln in Mikrotiterplatten mit ³²P-8-N₃-cAMP (80Ci/mmol, ICN 37003) gemischt, so daß sich eine Endkonzentration von 200nM einstellt. Nach 5min Belichten im Abstand von ca. 2cm mit einer CAMAC Universal UV-Lampe bei 254nm wurden die Proben mit 25 μ l SDS-Probenpuffer gemischt und 3min gekocht. Nach der Elektrophorese (4.2.1.) wurden die Gele Coomassie-gefärbt (4.2.3.1.), getrocknet und die Radioaktivität durch Autoradiographie detektiert. Die Quantifizierung erfolgte durch Ausschneiden und Zählen der Banden aus dem getrockneten Gel nach der Autoradiographie.

10x Photoaffinitäts-Puffer:	250	mM	MOPS, pH 7.0
	40	mM	MgCl ₂
	4	mM	EGTA
	50	mM	NaF

4.2.7. Messungen des cAMP-Relay und der cGMP-Antwort

6h suspensionsentwickelte Zellen werden auf eine Dichte von 6.25×10^7 Zellen/ml konzentriert und kontinuierlich mit O_2 belüftet. Die Stimulierung der Zellen für die cGMP-Antwort erfolgt mit $\frac{1}{5}$ Volumen $5 \times 10^{-5} M$ cAMP, für den cAMP-Relay mit $5 \times 10^{-5} M$ 2'd-cAMP, so daß sich Endkonzentrationen von 5×10^7 Zellen/ml und $1 \times 10^{-5} M$ Stimulans einstellen. Zu den angegebenen Zeitpunkten werden 50 μl Zellproben entnommen und zu 50 μl 3.5 % Perchlorsäure pipettiert, um die Reaktion zu stoppen und die Nukleotide aus den Zellen freizusetzen. Die Proben werden bis zum Assay eingefroren und sofort nach dem Auftauen mit 35 μl 50% gesättigtem $KHCO_3$ neutralisiert. Nach ca. 15min werden die Zellreste abzentrifugiert und der Überstand für die Bestimmungen eingesetzt. In diesen Lysaten befinden sich sowohl intrazelluläre als auch von den Zellen in das Medium sezernierte Nukleotide.

Der Test beruht auf der Kompetition des kalten Nukleotids der Probe mit zugesetztem Tritium-markiertem cAMP oder cGMP um die spezifischen Bindungsstellen an Detektorproteinen. Alle Assays wurden mit Amersham RIA-Kits (TRK 500, TRK 432) nach den Vorschriften der Hersteller durchgeführt, außer daß mit geringeren Volumina gearbeitet wurde:

<u>cGMP:</u>	15 μl	$8\text{-}^3H\text{-cGMP}$ ($20 \mu Ci/nmol$, $0.16 mCi/ml$)
	15 μl	Überstand der neutralisierten Proben
	15 μl	Antiserum

Nach der Ammoniumsulfatpräzipitation der Antikörper wird das Pellet in 125 μl H_2O aufgenommen und zum Zählen im β -Counter mit 5ml Scintillationsflüssigkeit versetzt.

<u>cAMP:</u>	20 μl	$8\text{-}^3H\text{-cAMP}$ ($20 \mu Ci/nmol$, $0.5 \mu Ci/ml$)
	20 μl	Überstand der neutralisierten Proben
	20 μl	cAMP Bindungsprotein

Das ungebundene cAMP wird an 40 μl Aktivkohlesuspension adsorbiert und abzentrifugiert, ein Aliquot des Überstandes wird mit 5ml Scintillationsflüssigkeit im β -Counter gezählt.

4.3. MONOKLONALE ANTIKÖRPER

4.3.1. vorhandene Antikörper

mAb 33-293-17	gegen csA
mAb 80-52-13	gegen Discoidin I
mAb 80-386-10	gegen R der cAdPK
mAb 83-418-1	gegen das Protein des cDNA-Klons A2C5
mAb MUD1	gegen ein Präspor-spezifisches Antigen
polyklonales Kaninchen-Serum	gegen Discoidin

4.3.2. Immunisierung der Mäuse

Pro Fusionstag wurden zwei SPF gezogene weibliche Balb/C Mäuse immunisiert, je eine mit Freund's Adjuvans (Behringwerke, OREC 20/21; ORED 20/21) und eine mit Alugel S (Serva 12261) als Adjuvans. Die erste Immunisierung erhalten die Tiere im Alter von 4 Wochen, der Booster erfolgt 4-6 Wochen nach der ersten Injektion, drei bis vier Tage vor dem Fusionstag. Alle Antigenpräparate werden in einem Volumen von nicht mehr als 200µl intraperitoneal gespritzt. Für Erstinjektion und Boosten wurden jeweils ca. 50µg Protein eingesetzt.

(Fusion 105) Maus 1 mit Freund's Adjuvans:

Erstinjektion:	1. Tag	40mg mit Freund's komplett.
Booster:	5. Woche	40mg mit Freund's inkomplett.

(Fusion 106) Maus 2 mit Alugel S:

Erstinjektion:	1. Tag	20mg
	5. Tag	20mg
	10. Tag	10mg
Booster:	30. Tag	50g
	Tags darauf	15mg ohne Adjuvans

(Fusion 111) Maus 3 mit Freund's Adjuvans:

Erstinjektion:	1. Tag	20mg mit Freund's komplett
	14. Tag	15mg mit Freund's inkomplett
Booster:	6. Woche	35mg mit Freund's inkomplett
	Tags darauf	20mg mit Freund's inkomplett.

(Fusion 112) Maus 4 mit Alugel S:

Primen:	1. Tag	20mg
	8. Tag	10mg
	17. Tag	10mg
Booster:	6. Woche	30mg
	Tags darauf	20mg ohne Adjuvans

4.3.3. Fusion und Anzucht der Hybridomas

4.3.3.1. Vorbereiten der Zellsuspensionen für die Fusion

Alle Zellen werden in autoklavierbaren Brutschränken bei 37°C, in einer Atmosphäre mit 5% CO₂ und 95% Luftfeuchte gezogen. Zentrifugationen werden 5min bei 1500rpm in einer Hettich Rotanta Kühlzentrifuge bei 4°C durchgeführt.

4.3.3.1.1. Myeloma-Zellen

Für die Fusion einer Milz werden zwei verschiedene Myeloma-Zelllinien verwendet, Sp2/01 5-4 Ag.res.5 ("Sp", kann in Fermentern gezüchtet werden) und X63-Ag8.653 ("Ag", keine endogenen IgG leichten Ketten).

Für zwei Milzen benötigt man 2×10^7 Myeloma-Zellen von jeder Linie: Eine Woche vor der Fusion taut man die Myeloma-Zelllinien frisch auf und kultiviert die Zellen in Normalmedium (NM) bis fünf 250ml Gewebekulturflaschen dichtgewachsen sind. Ein bis zwei Tage vor der Fusion erfolgt ein Mediumwechsel, um am Fusionstag exponentiell wachsende Kulturen ernten zu können. Dazu werden die Zellen schonend vom Flaschenboden abgeklopft, abzentrifugiert, einmal in RPMI 1640 oH Serum-frei gewaschen, in 20ml desselben Mediums resuspendiert, gezählt und bis zur Fusion kalt gestellt.

RPMI 1640 oH: (ohne Hepes) Gibco 320-1875

Normalmedium:	500	ml	RPMI 1640 mH, Gibco 380-2400
	5.5	ml	Fötales Kälberserum, Gibco 230-6290
	5.5	ml	10 ⁻³ M β -Mercaptoethanol, Merck 805740
	5.5	ml	Kanamycin, Gibco 600-5160
	5.5	ml	200mM Glutamin, Flow 16-801-48 (6-134C)

4.3.3.1.2. Makrophagen

Die Mäuse werden durch Genickdislokation mit einer starken Pinzette getötet und mit 70% Alkohol abgespritzt. Man öffnet das Bauchfell bis unter die Achseln und injiziert mit einer Spritze 5ml NM. Dann bewegt man leicht die Bauchdecke, um viele Peritonealmakrophagen im Medium zu suspendieren, das mit der Spritze wieder möglichst vollständig abgesaugt wird. Dieses Spülen der Bauchhöhle wird viermal wiederholt und das Medium mit den Makrophagen auf Eis gesammelt. Die Suspension wird abzentrifugiert und einmal mit NM gewaschen. Man stellt die Makrophagen auf eine Dichte von $2-4 \times 10^5$ Zellen/ml ein, impft die Wells von Costarplatten mit je 0.5ml an und kultiviert die Platten über Nacht.

Für die Fusion der Lymphozyten aus 2 Milzen werden 20 Costarplatten mit 24 Wells angeimpft, d.h. man benötigt $1-2 \times 10^8$ Makrophagen, die man aus 12 Mäusen gewinnt.

4.3.3.1.3. Milzzellen der Maus

Die Mäuse werden durch Genickdislokation getötet, die Milz unter sterilen Bedingungen entfernt und in eine Petrischale mit 5ml eiskühlem RPMI 1640 oH gelegt. Dort werden anhaftende Bindegewebsreste mit einer sterilen Schere so gut wie möglich entfernt, die gesäuberte Milz wird in eine Petrischale mit frischem Medium überführt. Nun wird die Milz mit sterilen Pinzetten auseinander gezupft, wobei die Lymphocyten frei werden. Man trennt freie Lymphocyten von Gewebsresten, indem man das Medium in eine Pipette aufsaugt, grobe Reststücke in der Pipette absitzen und auslaufen läßt. Die nun homogene Suspension gibt man in 50ml Falcon-Röhrchen. Die groben Milzreste werden im Homogenisator zerkleinert und durch eine sterile, mit Kunstfaserwolle gestopfte Spritze in das Falconröhrchen filtriert. Die Zellen werden gemeinsam abzenrifugiert, zweimal mit RPMI 1640 oH serumfrei gewaschen, in 5ml RPMI 1640 oH aufgenommen und im Eisbad bis zur Fusion aufbewahrt. Eine gesunde Milz ergibt erfahrungsgemäß 1×10^8 Lymphocyten, deren Aktivierungszustand man an der Anwesenheit von Lymphoblasten überprüfen kann.

Spritzen zum Filtrieren der Milzzellen:

Reine Kunstfaserwolle (609002, Schweizer COOP) wird in etwa 5cm lange Stücke geschnitten, mehrmals in 0.2N HCl gewendet und stehen gelassen. Anschließend wäscht man die Stücke in 5l H₂O dest. und trocknet sie im Trockenschrank. Eine sterile 10ml Spritze wird ca. 2cm hoch mit der Kunstfaserwolle locker gefüllt und autoklaviert.

4.3.3.2. Zellfusion

5×10^7 Milzzellen in 2.5ml RPMI 1640 oH werden mit 2.5×10^7 Myeloma-Zellen gemischt ($1/2$ der Milzzellen mit Sp2/O1 5-4 Ag.res.5, $1/2$ mit X63-Ag8.653), abzentrifugiert und einmal mit 5ml RPMI 1640 oH gewaschen. Da die verschiedenen Mischungen nacheinander fusioniert werden, inkubiert man gerade nicht bearbeitete Ansätze auf Eis. Von den gewaschenen Pellets zieht man die Überstände mit einer Pasteurpipette vollständig ab und gibt 0.5ml PEG-Lösung zu. Mit einer zugeschmolzenen Pasteurpipette mischt man die beiden Zellschichten (Myeloma unten, Milzzellen oben), ohne die Zellen vollständig zu suspendieren. Anschließend werden die Zellklumpen 1min im 37°C Wasserbad leicht geschüttelt, dann 1min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun werden über 5min hinweg 10ml RPMI 1640 oH tropfenweise unter leichtem Schütteln zupipettiert. Nach dem Abzentrifugieren saugt man den Überstand ab, nimmt das Pellet in 125ml Normalmedium auf und verteilt die Suspension auf zehn mit Makrophagen bestückte Costarplatten (0.5ml pro Well).

24h nach der Fusion gibt man in jedes Well 0.5ml 3-fach konzentriertes IAT-Medium zur Selektion der Hybridomas. Mediumwechsel erfolgt in den ersten zwei Wochen alle 3-4 Tage mit IAT-Medium, nach 14 Tagen wechselt man zu HT-Medium, nach einer weiteren Woche kann man auf Normalmedium übergehen.

Nach 3-4 Tagen sind kleine Klone erkennbar, wovon die ersten nach ca. 2 Wochen groß genug zum Testen sind (ca. $1/4$ des Wells bewachsen).

Fusion 105: Maus 1;		Well 1-240: Sp	Well 240-480: Ag
Fusion 106: Maus 2;		Well 1-240: Sp	Well 240-480: Ag
Fusion 111: Maus 3;		Well 1-240: Sp	Well 240-480: Ag
Fusion 112: Maus 4;		Well 1-240: Sp	Well 240-480: Ag
PEG-Lösung:	5 g	PEG-4000 (Polysciences 6102) in	
	5 ml	0.9% NaCl, pyrogenfrei (Fresenius, HCW 4902)	
HT-Medium:	570 ml	Normalmedium	
	5.7 ml	100x HT	
HAT-medium:	570 ml	Normalmedium	
	5.7 ml	100x HT	
	5.7 ml	100x A	
100x HT:	10 mM	Hypoxanthin (Merck 4517)	
	1.6 mM	Thymidin (Sigma T 9250)	
100x A:	40 nM	Aminopterin (Serva 13170)	

Das PEG und die 100x Stocklösungen werden sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

4.3.3.3. Selektion der gewünschten Zelllinien

Mit Homogenaten von 2×10^7 Zellen beladene, 10cm breite 10% ige Frontrunner Gele werden 3cm weit in das Trenngel laufen gelassen und die Proteine transferiert (4.2.1). Die Blots werden in ca. 2mm breite Streifen geschnitten und über Nacht in 0.4ml Eppendorfhütchen mit Überständen der bewachsenen Costarwells inkubiert. Tags darauf werden die Miniblots einzeln dreimal gewaschen, dann gemeinsam für 2h mit 1×10^6 cpm/ml ^{125}J -Sheep-anti-Mouse Antikörper inkubiert, erneut drei- bis viermal gewaschen, sortiert und über Nacht exponiert (3.3.4.)

4.3.3.4. Klonieren der Hybridoma-Zellen

Man stellt eine Verdünnung der Zellsuspensionen aus den Wells her und pipettiert mit einer ausgezogenen Pasteurpipette kleine Tropfen dieser Verdünnungen in die Öffnungen von Mikrotiterplatten mit flachem Boden. Man sucht diese Tropfen mikroskopisch ab und ermittelt so die Verdünnung, bei der sich im Durchschnitt in jedem Tropfen eine einzelne Zelle befindet. Mit Tropfen dieser Verdünnung wird eine Mikrotiterplatte bestückt und die Löcher, die nur eine Zelle enthalten, werden mit 50µl Makrophagensuspension gefüllt (Makrophagen einer Maus in 25ml Normalmedium). Nach einer Woche ist zu erkennen, welche Klone angewachsen sind (normalerweise ca. 50%). Wenn die Wells zu $\frac{2}{3}$ bewachsen sind, kann man den Überstand zum erneuten Testen abnehmen. Dazu werden die Testminiblots in einer feuchten Kammer auf Parafilm gelegt und mit dem Überstand

überschichtet, über Nacht inkubiert und dann weiterbehandelt wie oben (4.3.2.3.) beschrieben.

4.3.3.5. Aufzucht

Die positiven Klone werden von den Mikrotiterplatten in Costarwells und von dort in Gewebekulturflaschen wachsender Größe (25cm², 75cm², 200cm², mit 5ml, 20ml, 50ml Medium) überimpft. In den großen Flaschen wird dann alle 2-3 Tage Medium gewechselt, die Überstände werden zur Präparation von Antikörpern eingefroren.

4.3.3.6. Konservierung der Zelllinien

Zellen einer gut angewachsenen großen Gewebekulturflasche werden schonend abgeklopft, abzentrifugiert, in 6ml eiskaltem Einfriermedium aufgenommen und auf 6 Ampullen verteilt. Die Ampullen werden in die Einfrierköpfe der Stickstofftanks gestellt in einer Position, in der die Zellen um 1°C/min abgekühlt werden. Frühestens nach 3h können die Ampullen endgültig in den Tank eingeordnet werden. Tags darauf wird zum Test eine Ampulle im Wasserbad rasch aufgetaut, die Zellen mit 20ml Normalmedium gewaschen, in 10ml Medium aufgenommen und auf zwei kleine Flaschen verteilt. Da DMSO äußerst toxisch für metabolisch aktive Zellen ist, sollten alle Arbeitsgänge im Kalten und möglichst rasch ausgeführt werden.

Einfriermedium:	70	ml	RPMI 1640 mH (mit Hepes)
	20	ml	FCS (GIBCO 230-6290)
	12	ml	DMSO (Serva 20385)
	1	ml	10 ⁻³ M β -Mercaptoethanol

4.3.4. Reinigung von IgG

1l Kulturüberstand (4.3.2.5.) wird aufgetaut und mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung gemischt bis 55% Sättigung erreicht ist, 10min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend über Nacht bei 4°C ausgefällt. Das Präzipitat wird für 15min bei 8000g abzentrifugiert, in ca. 30ml Natriumphosphatpuffer (Na-P-Puffer, pH 8.0) resuspendiert und mit drei Wechseln gegen Na-P-Puffer über Nacht im Kühlraum dialysiert. Das Dialysat wird erneut abzentrifugiert (10min, 10000g), der Überstand auf eine mit Na-P-Puffer äquilibrierte Protein-A-Sepharose CL-4B Säule (0.7g Trockengewicht, Pharmacia 17-0780-01) aufgetragen: Das Dialysat wird einmal vollständig über die Säule gegeben und zirkuliert anschließend über Nacht bei einer Laufgeschwindigkeit von 0.5ml/min. Nach dem Auftragen wird die Säule mit 50ml Na-P-Puffer gespült, die Antikörper werden mit 150mM NaCl, 0.1M Essigsäure pH 4.0 eluiert. Die Position des Proteinpeaks wird über die OD₂₈₀ bestimmt, die Fraktionen gepoolt, sofort mit 0.5N NaOH neutralisiert und über Nacht im Kaltraum gegen PBS, pH7.2 dialysiert. Die

Antikörperlösungen (Abb. 1) werden auf Eis oder schockgefroren bei -80°C aufbewahrt. Aus einem Liter Kulturüberstand gewinnt man in der Regel 3-5mg IgG. Die Säulen werden vor dem Wiedergebrauch mit 150mM NaCl, 0.5M Essigsäure gespült und mit Na-P-Puffer reäquilibriert.

Na-P-Puffer: 140 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 8.0

PBS 100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7.2
150 mM NaCl

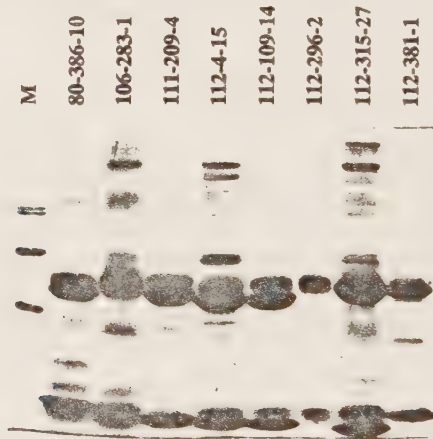


Abb. 3: Aufgereinigtes IgG der verwendeten monoklonalen Antikörper

4.3.5. Immunoblots

4.3.5.1. jodierte Antikörper

4.3.5.1.1. Immunoblots mit direkt jodierten Antikörpern

4.3.5.1.1.1. Jodierungsprotokoll

Alle Jodierungen wurden von Herrn Dr. J. Stadler ausgeführt.

- Neutralisierung des trägerfreien Natrium- ^{125}I Jodid (1mCi/10 μl , Amersham IMS 30) mit 90 μl PBS pro 10 μl Iodid.
- Zugabe von 70-150mg gereinigtem IgG in PBS (0.2-1.5mg/ml).
- Zugabe von 30-50 μl Chloramin-T-Lösung (Merck, 0.3mg/ml in PBS, frisch angesetzt), gut mischen, insgesamt 45sec einwirken lassen.
- Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 100 μl gesättigter L-Tyrosin-Lösung (0.1M in PBS).

- e) Zugabe eines Marker-Mixes aus Phenolrot und Dextranblau.
- f) Abtrennen des freien Jods durch Chromatographie auf einer Sephadex-G50 Säule in einer 10ml Einmalpipette, äquibriert mit PBS.
- g) Sammeln der blauen Fraktionen und Zugabe eines Volumens 2% BSA, 1% NaN_3 in PBS.
- h) Bestimmen der Ausbeute durch Zählen von 10 μ l im γ -Counter: Sollwert 2×10^7 - 1×10^8 cpm/ml.
- i) Aufbewahren der Antikörper bei 4°C.

4.3.5.1.1.2. Immunmarkierung mit direkt jodierten Antikörpern

Direkt nach dem Transfer werden die Bindungsstellen der Nitrocellulose für mindestens 15min durch leichtes Schütteln der Blots in Tris-Waschpuffer abgesättigt. Danach werden die Blots für 2-16h mit den jodierten Antikörpern inkubiert, die in Tris-Waschpuffer mit 8% BSA und 1% NaN_3 auf 1×10^6 cpm/ml verdünnt wurden, und anschließend fünfmal 10min mit Tris-Waschpuffer gewaschen. Nach kurzem Trocknen der Blots werden die Autoradiogramme (Kodak X-omat, AR-5) in der Regel über Nacht mit Cronex quanta II Intensifying Screens bei -80°C belichtet.

Tris-Waschpuffer:	10	mM	Tris/HCl, pH 7.5
	150	mM	NaCl
	0.05	%	Tween 20

4.3.5.1.2. indirekte Blots mit jodierten zweiten Antikörpern

Die durch Tris-Waschpuffer abgesättigten Blots werden (4.3.5.1.2.) mindestens 2h mit kalten primären Antikörpern einer Konzentration von 40 μ g/ml in 8% BSA und 1% NaN_3 in Tris-Puffer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Tris-Puffer inkubiert man die Blots für weitere 2h mit dem ^{125}J -markiertem zweiten Antikörper (Sheep-anti-Mouse IgG, Amersham IM 131), der mit Tris/BSA/Azid-Puffer 1:200 verdünnt wurde. Danach werden die Blots weiterbehandelt wie oben beschrieben.

4.3.5.3. Streptavidin-Biotin verstärkte Peroxidase-Färbung

Da Azid die Peroxidase-Reaktion stört, werden alle Lösungen ohne Azid angesetzt.

- a) Die Blots werden direkt nach dem Transfer 20min bei Raumtemperatur (RT) in 0.1% Tween 20 in PBS gewaschen,
- b) 1h bei 37°C inkubiert mit 3% BSA in PBS, oder 3% Trockenmilchpulver in PBS,
- c) 5x 5min mit 0.1% Tween 20 in PBS gewaschen,
- d) 1h bei RT inkubiert mit 1 μ g/ml erstem Antikörper in 1% BSA in PBS,
- e) 3x kurz mit 0.1% Tween 20 in PBS gewaschen,
- f) 1h bei RT inkubiert mit biotinyliertem SAM (Amersham, RPN 1021), 1:400 verdünnt in PBS,

- g) 3x kurz bei RT mit 0.1% Tween 20 in PBS gewaschen,
- h) 1min bei RT inkubiert mit Streptavidin-biotinyliertem Merrettichperoxidase Komplex (Amersham, RPN 1051),
- i) 3x kurz mit 0.1% Tween 20 in PBS gewaschen,
- k) ad. lib. in:

0.25	mg/ml	Diaminobenzidin (Sigma D 5637)
0.015	%	Kobalt(II)-Chlorid
0.015	%	Nickel(II)-Sulfat
0.01	%	H ₂ O ₂

4.3.6. Immunpräzipitation

Für je einen Immunpräzipitationsansatz werden 1×10^7 Zellen in Eppendorfhütchen abzentrifugiert, in 100µl PBS, 5mM Benzamidin aufgenommen und durch Einfrieren und Auftauen lysiert; alle folgenden Schritte werden bei 4°C ausgeführt. Das Zellhomogenat wird in der Airfuge (Beckmann) 30min mit 30PSI abzentrifugiert und der klare Überstand löslicher Proteine über Nacht mit 5µg IgG inkubiert. Zur Fällung der Immunkomplexe gibt man 50µl Protein-A-Sepharose-Suspension zu (1 Teil gequollene Beads : 4 Teile PBS, 5mM Benzamidin) und inkubiert die Mischung 30min auf dem Schnellschüttler bei ca. 300rpm. Die Beads werden kurz abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und 3min in 30µl SDS-Probenpuffer gekocht. Die Überstände der Präzipitation werden mit 1/2 Volumen SDS-Probenpuffer gekocht und als Kontrolle mitgeführt. Als Nullprobe dient ein Ansatz ohne IgG. Die Proben werden auf 10% PAGE-Gelen aufgetrennt, geblottet und mit dem ¹²⁵I mAb 80-386-10 inkubiert.

4.3.7. Immunfluoreszenz von Präspor-Zellen aus dissoziierten Slugs

Zur Dissoziation werden die Slugs einzeln mit einer Spritze vom Agar abgenommen und ca. 1h in 100µl Cellulaselösung inkubiert. Nach dem Mischen der Zellsuspension mit 8% Formaldehyd in KK₂ und 10 minütigem Fixieren zentrifugiert man in einer speziellen Halterung je 150µl einer Verdünnungsreihe der Zellen auf kollagenbeschichtete Objektträger. Nach dem Absaugen der Überstände und Trocknen der Objektträger markiert man diejenigen Felder, die eine ausreichende Zelldichte aufweisen, für 1h mit dem Präspor-spezifischen monoklonalen Antikörper MUD1. Man wäscht die Objektträger dreimal in H₂O dest., läßt sie erneut trocknen und überschichtet die Felder mit FITC-gekoppeltem SAM. Nach abermaligem Waschen, Trocknen und Einbetten in Tris/Glycerin sind die Präparate fertig zum Mikroskopieren. Die Anregung des FITC erfolgt bei 490nm, die Detektion bei 515-565nm.

Kollagenbeschichtete Objektträger: Zum besseren Anhaften der Zellen werden 150µl Kollagenlösung (0.125mg/ml) gleichmäßig auf Corning Objektträgern ausgestrichen und ca. 5h bei 80°C getrocknet.

Cellulase:	20	mM	$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 6.0
	10	mg/ml	Cellulase (Onozuka R-10, Serva 16419)
	150	mM	NaCl
	2	mM	EDTA

MUD1: unverdünnte Kulturüberstände oder 50µg/ml IgG

SAM: 20µl in 800µl PBS

Tris/Glycerin: 1 Teil Tris/HCl, pH 8.0, 3 Teile Glycerin
20mg/ml DABCO (gegen Bleichen des FITC, Langanger et al., 1983)

4.4. MUTANTENSELEKTION

4.4.1. Mutagenese

Die Mutagenese wurde von Herrn Dr. G. Gerisch durchgeführt. Eine exponentielle 300ml Kultur wird geerntet, zweimal mit Phosphatpuffer gewaschen und auf eine Dichte von 8×10^7 Zellen/ml eingestellt. Die Zellen werden im Verhältnis 1:3 mit N'-Methyl-N'-Nitro-N'-Nitrosoguanidin (Sigma M7629, 2mg/ml in Phosphatpuffer pH 7.0) gemischt, so daß sich Endkonzentrationen von 2×10^7 Zellen/ml und 1.5mg/ml Nitrosoguanidin einstellen. Diese Zellsuspension wird lichtgeschützt 20min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert, anschließend zweimal mit Phosphatpuffer pH 7.0 und zweimal mit Phosphatpuffer pH 6.0 gewaschen. Das Pellet wird in 300ml AX-Medium suspendiert (Zelldichte ca. $1 \cdot 2 \times 10^6$ /ml), auf 10 Kolben verteilt und lichtgeschützt 1.5h bei 23°C und 220rpm geschüttelt. Anschließend werden die Zellen so auf NA-Agarplatten ausplattiert, daß bei einer Überlebensrate von 5% pro Platte ca. 50 Klone anwachsen. Alle mit dem Nitrosoguanidin in Berührung gekommenen Materialien werden zum Entgiften über Nacht in 10% Essigsäure gelegt.

4.4.2. Screening nach dem Kolonieblotverfahren

Von den Klon-Platten werden einzeln liegende Kolonien mit Zahnstochern in ein regelmäßiges Raster (56 Kolonien/Platte) parallel auf zwei frische SM-Platten überimpft. Nach 2-3 Tagen Wachstum wird eine der beiden Parallelplatten zum späteren Abimpfen kaltgestellt, die zweite Platte wird zum Testen der Kolonien verwendet. Dazu legt man runde Nitrocellulosefilter luftblasenfrei auf die Agaroberfläche, wartet kurz bis die Filter feuchtgesogen sind und hebt sie dann von den Platten ab. Die Hauptmasse der *Dictyostelium*-Zellen und Bakterien haftet jetzt an der Nitrocellulose. Um cytoplasmatische Proteine freizusetzen, werden die Zellen lysiert, indem man die feuchten Filter auf Trockeneis-gekühlten Metallplatten einfriert und bei Raumtemperatur auftaut. Ungebundenes Zellmaterial und Bakterien werden durch Spülen der Blots mit Tris-Waschpuffer (4.3.5.1) entfernt. Die Kolonieblots werden anschließend zur Immunmarkierung spezifischer Proteine verwendet.

4.5. MOLEKULARBIOLOGIE

4.5.1. verwendete DNA-Fragmente und ihre Vektoren

- a) cDNA Klon der Regulatorischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Protein-Kinase aus *Dictyostelium discoideum*: RD10.1 in pUC 8 (Abb. 4)
- b) *Dictyostelium*-Transformationsvektor: pDNeoII (Abb. 5)
- c) PBL2 mit Tn903 in pUC
- d) laborinterne entwicklungsregulierte Klone in p2732B (Gerisch et al, 1985; Noegel et al, 1985) (Tab. 1)
- e) cDNA Klon der Phosphodiesterase: PD in bGem4
- f) cDNA Klon des Adhäsionsproteins csA in pUC

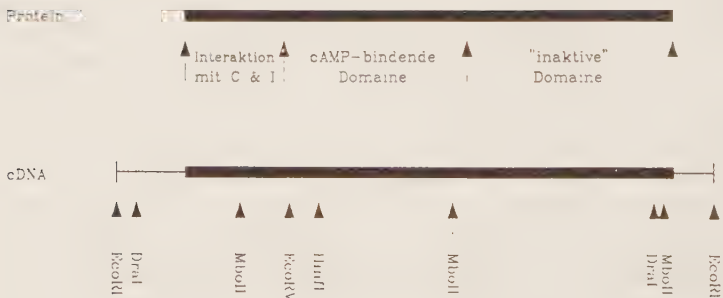


Abb. 4:
Schematische Darstellung des cDNA-Klons RD10.1 und der codierten Regulatorischen Untereinheit

Die Klone RD10.1 (Abb. 4), PD und csA wurden aus der Expressions-cDNA-Bank aus t₃-RNA von M.-L. Lacombe mit spezifischen Antikörpern für die Regulatorische Untereinheit der cAdPK (Mutzel et al. 1987), die Phosphodiesterase (Lacombe et al., 1986) und csA (Noegel et al., 1985) kloniert.

Die Klone A2C5, A11B6, A11H2, M7E5, P23E4, P26E8, P29F8, P52H11 und cUbiI stammen aus einer cDNA-Bank, die aus polysomengebundener polyA-RNA von t₆-Zellen konstruiert wurde, und wurden wegen der Entwicklungsregulation der korrespondierenden RNAs selektioniert (Tab. 1).

Die Expression der RNA des Klon P52H11 und der kleinsten RNAs des Ubiquitins nimmt während der Entwicklung ab, wird aber nicht vollständig abgeschaltet.

Eine Unterteilung der restlichen Klone, deren Transkripte während der Entwicklung vermehrt abgelesen werden, erfolgte nach ihrem Vorhandensein in vegetativen Zellen. Bereits in solchen Zellen nachweisbar sind die RNAs der Klone A2C5, A11B6, P23E4 und P26E8. Diese RNAs zeigen eine zum Teil ganz erheblich verstärkte Expression nach Beginn der Entwicklung.

Eine strikte Regulation, d.h. eine Induktion vorher nicht exprimierter Gene und cAMP-Stimulation ist für die Klone A11H2, M7E5, P29F8, csA und PD beschrieben.

cDNA	Insert	RNA	t	Agg ⁻	Pulseff	Coffein	Probe	Protein
P52H11	400	<400	0	+	-	?	NT	unbekannt
A11B6	710	1200	0	+	-	-	NT	unbekannt
P23E4	700(390)	1600	0	+	-	-	NT	unbekannt
P26E8	300	1100	0	+	(+)	+	NT	unbekannt
A2C5	1700	1700	2	-	(+)	+	NT	unbekannt
A11H2	960(300)	1600	2	-	+	o	NT	α-Fucosidase
M7E5	1300	1200	4	-	+	o	NT	unbekannt
P29F8	1100	2100	4	-	+	o	NT	Adhäsionsprotein
csA	1800	1800	4	-	+	o	NT	Adhäsionsprotein
PD	1700	3000	2	?	+	?	RP	cAMP-PDE
RD	1400	1700	0	?	(+)	?	NT/RP	R der cAdPK
cUBI	150	div	0	?	+	+	NT	Ubiquitin

Tab. 1 :

Kurze Charakterisierung der entwicklungsregulierten Klone. t = früheste Nachweisbarkeit der RNA in Suspensions-entwickelten Zellen (Zeit in Stunden); Agg⁻ = Expression in nichtaggregierenden Mutanten des Stammes HG302; Coffein = Expression in coffeinbehandelten AX2 Zellen (+ = Stimulation, o = kein Einfluß, - = Hemmung); NT = Nicktranslation; RP = Riboprobe

Der Transformationsvektor Vektor pDNeoII (Witke et al., 1987) ist auf der Basis des Transformationsvektors B10SX (Nellen et al., 1984; Nellen & Firtel, 1985; Knecht et al., 1986) aufgebaut : Er besitzt die Multiple Cloning Site des pIC20H (Marsh et al., 1984), die flankiert ist vom *Dictyostelium* Actin-6-Promotor und einer Tandem Anordnung des Aktin-8-Terminators. Gegenläufig zum inserierten Fragment wird der Selektionsmarker Neomycinresistenz abgelesen, dessen Transkription vom Aktin-15-Promotor und -Terminator gesteuert wird (Abb. 5). Der Vektor kann nicht extrachromosomal repliziert werden und muß in das Wirtsgenom integrieren, um stabile Transformanten zu erzeugen.

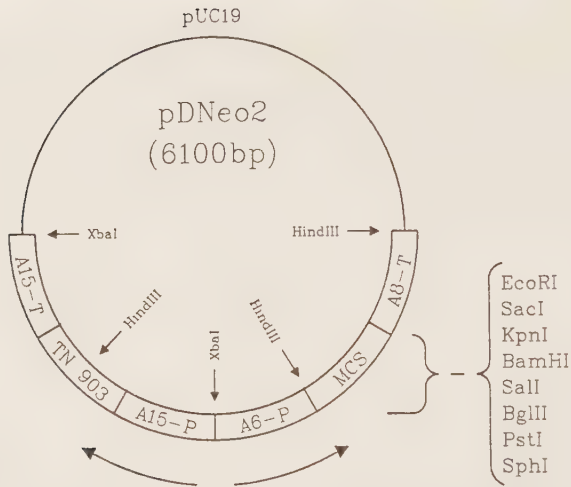


Abb. 5:

Schematische Darstellung des Transformationsvektors pDNeoII. A = Aktin, MCS = Multiple Cloning Site; P = Promotor; T = Terminator. TN903 = Neomycinresistenz

4.5.2. Transformation von *E. coli*

4.5.2.1. verwendete Stämme

JM 109: Yanish-Perron et al., (1985)

MC 1061: Casadaban & Cohen, (1980)

4.5.2.2. Transformationsprotokoll (Mandel & Higa, 1970)

Man impft die Bakterien von einer Stammplatte in 5ml LB-Medium an und inkubiert die Kultur über Nacht bei 37°C. Nachdem man die Bakterien 1:100 in 50ml frisches LB-Medium verdünnt hat, läßt man die Kultur innerhalb von 2-3h heranwachsen bis eine apparente OD₅₀₀ von 0.4-0.5 erreicht ist. Die Zellen werden dann 20min auf Eis abgekühlt, in vorgekühlten Röhrchen abzentrifugiert (5min, 4000g), nacheinander mit 20ml und 10ml 0.1M eiskaltem CaCl₂ gewaschen und in 2ml 0.1M CaCl₂ resuspendiert. Nach mindesten 30min Inkubation auf Eis sind die Zellen transformationskompetent.

Man mischt 0.5-1µg Plasmid mit 0.2ml kompetenten Zellen und inkubiert 30-60min auf Eis. Danach werden die Zellen für 1.5min einem 42°C Hitzeschock ausgesetzt und 1h in 1ml LB-Medium zur Expression der Resistenzmarker bei 37°C auf dem Schüttler wachsen

gelassen. Anschließend werden die transformierten Zellen selektiert, indem man eine Verdünnungsreihe auf Ampicillin-Platten austreicht und über Nacht bei 37°C kultiviert. JM109 wird auf Ampicillin-Platten ausgestrichen, die zusätzlich 20µg/ml IPTG und 20µg/ml XGal enthalten. Kolonien mit rekombinanten Plasmiden erscheinen auf diesen Platten weiß im Gegensatz zu den blauen Klonen mit Vektoren ohne Inserts.

LB-Medium:	1.0	%	Trypton (Difco Bacto)
	0.5	%	Hefeextrakt (Oxoid)
	0.5	%	NaCl

Amp-Platten:			LB-Medium
	1.5	%	Agar
	100	µg/ml	Ampicillin

4.5.3. Oligonukleotide

Drei Oligonukleotide mit folgenden Sequenzen wurden von Jürgen Wippler an einem DNA-Synthesizer von Applied Biosystems nach der Phosphoramiditmethode (Beaucage and Caruthers, 1981) synthetisiert:

a) "H" : 5' TAA AGC TAA TTC ACC AAA ACT ACC 3'

Dieses Oligonukleotid überspannt einen Sequenzteil des Genes der Regulatorischen Untereinheit aus *Dictyostelium discoideum*, der vollständige Homologie zu den Säuger Proteinen RI und RII aufweist und aus der cAMP Bindestelle stammt.

b) "S" : 5' AGC TGG TTT ATC TCC CAG TGG TTC 3'

Diese Sequenz ist *Dictyostelium*-spezifisch und besitzt keinerlei Homologie zu den Säugerproteinen.

Die Oligonukleotide H und S sind komplementär zum kodierenden Strang des cDNA Klones und können zum Proben von Northern-Blots verwendet werden.

c) "P" : 5' AAG CTT GCA TGC CTG CAG 3'

Dieses Oligonukleotid wurde hergestellt, um durch Ansequenzieren problemlos die Orientierung der Inserts im Transformationsvektor pDNeoII bestimmen zu können. Die Sequenz stammt aus dem Anfangsbereich der Polylinkerstelle: sie überdeckt die *Hind*III und die *Sph*I Site. Es kann daher nicht für Konstrukte verwendet werden, bei denen diese Enzyme zum Inserieren benutzt wurden. Für die benachbarte *Pst*I Schnittstelle können nur blunt-end-Ligationen nicht verwendet werden.

4.5.4. Restriktionsenzyme und Inkubationsbedingungen (Maniatis, 1982)

Enzym	Puffer	Temperatur
<i>Bgl</i> II	l	37°C
<i>Dra</i> I	l	37°C
<i>Eco</i> RI	h	37°C
<i>Eco</i> RV	m	37°C
<i>Hind</i> III	m	37°C
<i>Mae</i> III	mae	55°C
<i>Rsa</i> I	m	37°C
<i>Sma</i> I	sma	25°C

"l"	"m"	"h"		Standard Puffer
10	10	50	mM	Tris/HCl pH 7.5
0	50	100	mM	NaCl
10	10	10	mM	MgCl ₂
1	1	1	mM	DTT

<i>Sma</i> I Puffer:	10	mM	Tris pH 8.0
	20	mM	KCl
	10	mM	MgCl ₂
	1	mM	DTT

<i>Mae</i> III Puffer:	20	mM	Tris/HCl pH 8.2
	275	mM	NaCl
	6	mM	MgCl ₂
	7	mM	β-Mercaptoethanol
	100	mg/ml	BSA

4.5.5. Präparationen

4.5.5.1. Plasmid-DNA aus *E. coli* und Insertisolierung

4.5.5.1.1. Promega-Präparation (Birnboim & Doly, 1979)

Man impft mit einer einzelnen Kolonie von einer Platte in 250ml LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin an und zieht die Zellen über Nacht bei 37°C. Die Bakterien werden bei 4°C 15min mit 5000g abzentrifugiert, resuspendiert in 6ml 25mM Tris/HCl (pH 8.0), 10mM EDTA, 15% Saccharose, 2mg/ml Lysozym (Sigma) und 10min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 12ml einer frisch angesetzten Lösung von 0.2M NaOH, 1% SDS erfolgt die Lyse für 10min im Eisbad. Durch Zugabe von 7.5ml 3M Na-Acetat pH 4.6 wird die chromosomale DNA für 20min auf Eis ausgefällt. Man zentrifugiert das Präzipitat bei 33000g für 15min ab. Der Überstand wird 20min bei 37°C RNase verdaut (100µl einer Lösung von 30mg/ml) und zweimal extrahiert mit Phenol/Chloroform. Danach fällt man die Plasmide durch Zugabe von zwei Volumina Ethanol aus. Das

Präzipitat wird mit 9500g für 20min abzentrifugiert, getrocknet und resuspendiert in 1.6ml H₂O. Zur erneuten Fällung gibt man 0.4ml 4M NaCl und 2ml 13% PEG 8000 zu und inkubiert für 60min auf Eis. Der Niederschlag wird für 10min mit 15000g abzentrifugiert, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 300-500µl TE aufgenommen.

TE: 1 mM EDTA
 10 mM Tris, pH 8.0

Phenol/Chloroform: Phenol wird im 65°C Wasserbad geschmolzen und mit autoklaviertem 1M Tris, pH 8.4 gesättigt. Um Oxidation zu vermeiden, wird diese Stammlösung "Phenol" eingefroren und nur in kleinen Aliquots 1:1 mit Chloroform gemischt und im Kühlschrank lichtgeschützt aufbewahrt. (Zur Unterstützung der Phasentrennung kann man das Chloroform 1:25 mit Isoamylalkohol mischen)

4.3.5.5.2. Minipräparation/Boiling-Methode

Man nimmt mit einer Öse von einer Agarplatte Bakterien ab und suspendiert sie in 0.35ml STET mit 0.8mg/ml Lysozym. Nach der Lyse durch 45sec Kochen zentrifugiert man, gibt zum Überstand 0.2ml 5M Ammoniumacetat und fällt die Plasmide mit 1ml Isopropanol für 10min bei -20°C. Das Pellet wird abzentrifugiert, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30µl TE aufgenommen.

STET: 8 % Saccharose
 50 mM EDTA
 5 % Triton X-100
 50 mM Tris, pH 8.0

4.5.5.1.2. Insertisolierung (Dretzen et al., 1981)

Für präparative Insertreinigung verwendet man 1%ige Tris/Borat-Agarosegele, 20x20cm (4.5.6.1.). Nach dem Lauf werden die Gele mit Ethidiumbromid gefärbt, kurz vor und kurz hinter den gewünschten Banden geschnitten und DE-81 Ionenaustauschchromatographiepapier (Whatman) zwischen die Agarosestücke gelegt. Die Puffertanks werden soweit geleert, daß das Gel nicht mehr unter Puffer steht, die elektrische Verbindung wird durch angefeuchtetes Whatman 3mm Papier hergestellt. Nun läßt man die DNA-Fragmente bei ca. 300V auf das DE-Papier laufen. Für die Elution wäscht man das DE-Papier in einem durchstoßenen Eppendorf tube, indem man viermal 150µl Waschpuffer durchzentrifugiert, inkubiert es dann viermal je 5min mit 150µl Elutionspuffer und sammelt die Eluate. Diese werden dann durch Zugabe von zwei Volumina Ethanol ausgefällt, abzentrifugiert, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50µl TE aufgenommen.

Waschpuffer: 10 mM Tris, pH 7.5
 1 mM EDTA
 100 mM LiCl

Elutionspuffer: 10 mM Tris, pH 7.5
 1 mM EDTA
 1 M LiCl
 20 % Ethanol

4.5.5.2. chromosomale DNA aus *Dictyostelium* (Nellen et al., 1987)

4.5.5.2.1. Präparation mit CsCl-Gradienten

Bis zu 1×10^{10} bakterienfreie Zellen werden aus dem Phosphatpuffer abzentrifugiert, in 50ml eiskaltem destilliertem Wasser resuspendiert und zweimal gewaschen. Man lysiert die Zellen durch Suspendieren in Kern-Lyse-Puffer (50ml pro 5-10ml Zellpellet), und zentrifugiert die Kerne bei 10000g für 10min. Man nimmt das Pellet in Kern-Lyse-Puffer auf (Gesamtvolumen 1ml) und setzt die DNA durch tropfenweises Mischen mit 5ml auf 65°C vorgewärmtem EDTA/Sarcosyl aus den Kernen frei. Nach Zugabe von 5.5g CsCl und 0.1ml Ethidiumbromid (10mg/ml) füllt man mit TE auf 12g auf und zentrifugiert bei 15°C bei 150000g für 2 Tage. Man entnimmt die fluoreszierende DNA-Bande mit einer rundgeschmolzenen Pasteurpipette, füllt mit 6.6.2. auf das doppelte Volumen auf, überschichtet mit zwei Volumina Ethanol und dreht die DNA aus. Der DNA-Faden wird mit 1-2ml absolutem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 6.6.2. aufgenommen.

Kern-Lyse-Puffer: 10 mM MgAcetat₂
 10 mM NaCl
 2 % NP-40
 10 % Saccharose
 30 mM Hepes/NH₃, pH 7.5, sterilfiltrieren

EDTA/Sarcosyl: 0.2 M EDTA, pH 8.4
 1 % Sarcosyl

6.6.2. 6 mM Tris/HCl, pH 7.2
 6 mM NaCl
 0.2mM EDTA

4.5.5.2.2. DNA-Minipräparation

$1-5 \times 10^8$ Zellen werden abzentrifugiert, zweimal mit eiskaltem Wasser gewaschen und in 5ml Kern-Lysepuffer aufgenommen. Nach der Lyse der Zellen werden die Kerne abzentrifugiert (20min, 6000g) und in 1-2ml Kern-Lyse-Puffer resuspendiert. Dazu gibt man Stammlösungen, so daß sich Endkonzentrationen von 0.5% SDS und 100µg/ml

Proteinase K einstellen. Der Ansatz wird 30min bei 65°C inkubiert, bis die Lösung klar ist. Anschließend wird einmal mit Phenol extrahiert und aus dem Überstand die DNA ausgedreht.

4.5.5.3. RNA aus *Dictyostelium discoideum*

Alle Arbeitsgänge müssen mit autoklavierten Eppendorfhütchen und Pipettenspitzen durchgeführt, alle Lösungen in RNase freiem H₂O/DEP angesetzt werden .

Bis zu 1x10⁸ Zellen werden abzentrifugiert und durch Suspendieren in 0.9ml Guanidinium-Lösung lysiert. Man mischt die klare Lösung mit 0.1ml 3M NaAcetat, pH 4.7, extrahiert einmal mit Phenol/Chloroform und zentrifugiert die Proben zur Phasentrennung. Die RNA in der Oberphase wird nach Zugabe eines Volumens Isopropanol für 1h bei -20°C ausgefällt und abzentrifugiert. Man löst das Pellet in 0.6ml Guanidinium-Lösung (evt. etwas erwärmen), gibt 60µl NaAcetat zu, extrahiert erneut mit Phenol/Chloroform und fällt mit Isopropanol aus. Die RNA wird abzentrifugiert, mit 70% Ethanol gut gewaschen, getrocknet und unter Erwärmen in 100-500µl H₂O/DEP gelöst. Von einer 1:100 Verdünnung dieser RNA-Lösung bestimmt man die OD_{260/280} und errechnet die RNA-Konzentration (OD₂₆₀ von 1 =40µg/ml). Alle RNA-Proben werden bei -80°C aufbewahrt.

Guanidinium-Lösung inkomplett (löst sich bei 65°C):

4	M	Guanidiniumthiocyanat (Fluka, 50990)	250	g		
25	mM	NaCitrat, pH 7.0	17.6	ml	750	mM
0.5	%	Sarcosyl	26.4	ml	10	%
		H ₂ O	293	ml		

Guanidiniumlösung komplett: 50ml inkomplett, 0.36 ml β-Mercaptoethanol (100mM)

Phenol/Chloroform: Phenol wird verflüssigt und mit sterilfiltriertem 1M Hepes, pH 7.5 gesättigt und 1:1 (v/v) mit Chloroform gemischt (4.5.5.1.1.)

H₂O/DEP: 5l H₂O bidest. werden mit 2ml Diethylpyrocarbonat (Sigma D 5758) versetzt über Nacht gerührt und anschließend autoklaviert.

4.5.5.4. Oligonukleotide

Nach der Synthese werden durch Inkubation bei 55°C die Basenschutzgruppen abgespalten. Die weitere Aufreinigung erfolgt über eine reversed-phase HPLC. Dazu wird die Probe bis zur Trockne eingengt und in 400µl Startpuffer aufgenommen (10% Acetonitril in 0.1M Triethylammoniumacetat). Unlösliche Bestandteile werden verworfen und 5µl für einen analytischen, 95µl für einen präparativen Lauf eingesetzt.

HPLC-Einheit:	Säule:	Organogen Hd Sil 18-55-100
	Steuerung:	Kontron Anacomp 220
	Pumpen:	zwei Beckman 114 M
	Detektion:	Kontron Unikon 740 cc, 254 und 280nm

Die Zusammensetzung des Laufpuffers wird von den beiden Pumpen gemischt aus Puffer A (0.1M Triethylammoniumacetat) und Laufmittel B (Acetonitril). Die Flußrate beträgt 2ml/min.

Laufprogramm:	Zeit (min)	Laufpuffer (%B)
	0	10 = Laden
	1.5	10
	2	15
	23	34 = Elutionsgradient
	25	40 = Spülen der Säule
	27	10
	30	10 = Reäquilibrieren

Die Oligonukleotide eluieren je nach Länge und Basenzusammensetzung bei einer Acetonitrilkonzentration von 25-30%. Die oligonukleotidhaltigen Fraktionen werden zur Trockne eingengt, in 100µl 80% Essigsäure aufgenommen und 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Unlösliche Reste werden verworfen, der Überstand einrotiert, in 100µl TE aufgenommen und drei- bis viermal mit Ether extrahiert. Der restliche Ether wird 10min bei 60°C abgedampft und eine Konzentrationsbestimmung über die OD₂₆₀ vorgenommen.

4.5.6. Agaroseflachbettgele und Blots

4.5.6.1. DNA-Gele und Southern-Blots

4.5.6.1.1. Gele (Maniatis, 1982)

Gele für die Insertisolierung werden im Tris/Borat-Puffersystem gefahren, alle übrigen DNA-Gele (analytisch und präparativ zum Blotten) werden in dem Tris/Phosphat-Puffersystem von Loening angesetzt mit 0.7-1.5% Agarose. Vor dem Auftragen werden alle Proben ca. 10:1 mit DNA-Probenpuffer versetzt.

Tris/Borat:	89 mM	Tris, pH 8.0
	89 mM	Borsäure
	2 mM	EDTA

Tris/Phosphat:	80 mM	Tris/Phosphorsäure, pH 8.0
	8 mM	EDTA

Probenpuffer:	20	ml	TE, pH 8.0
	10	g	Saccharose
	1	ml	SDS, 10%
			Bromphenolblau

4.5.6.1.2. Southern-Blots (Southern, 1975)

Die Gele werden nach dem Lauf mit Ethidiumbromid angefärbt und photographiert. Anschließend wird die DNA 1h bei Raumtemperatur denaturiert, das Gel neutralisiert und durch Kapillarsog mit 10x SSC auf Nitrocellulose oder Nylonmembranen (Pall Biotec) Nylon Membranes P/N BNRG3R, Rating 0.2µm) geblottet.

Denaturieren:	1h	0.5	M	NaOH
		1.5	M	NaCl
Neutralisieren:	1h	1	M	Tris/HCl, pH 8.0
		1.5	M	NaCl
20x SSC:	1/2h	3	M	NaCl
		300	mM	Trinatriumcitrat, autoklavieren

4.6.5.1.3. *E. coli* Kolonieblots (Maniatis, 1982)

Transformierte *E. coli* Kolonien (4.5.2) werden zum Testen der Plasmidinserts in ein regelmäßiges Raster auf Selektionsplatten überimpft. Nach dem Anwachsen legt man einen Nitrocellulosefilter auf die Platte und zieht ihn ab sobald er durchfeuchtet ist. Die Bakterien werden lysiert, indem man den Filter für 3min auf einen 5ml Tropfen 0.5M NaOH legt. Man neutralisiert die Filter dann für je 5min auf zwei 5ml Tropfen mit 1M Tris/HCl pH 7.5, wäscht sie einmal mit 2x SSC und bäckst sie 2h bei 80°C.

4.5.6.2. RNA-Gele und Northern-Blots

4.5.6.2.1. Gele (Lehrach et al., 1977)

Ein 20x20cm Gel wird angesetzt aus 150ml H₂O/DEP, 20ml 10x Gelpuffer und 2g Agarose, aufgekocht und auf 50°C abgekühlt. Dann erst gibt man 32ml 37% Formaldehyd zu (Endkonzentration 6%) und gießt das Gel. Zur Denaturierung mischt man die RNA mit RNA-Probenpuffer (1:1 bis 1:3), erhitzt sie für 10min auf 65°C. Nach raschem Abkühlen auf Eis gibt man 1/10 Volumen Loading-Puffer zu und trägt die Proben sofort auf, um Renaturierung und Degradation zu vermeiden. Pro Spur werden 10µg RNA geladen, das Gel läuft mit 40V über Nacht.

10x Laufpuffer:	200	mM	MOPS, pH 7.0
	50	mM	NaAcetat
	10	mM	EDTA
10x Gelpuffer:	200	mM	MOPS, pH 8.0
	50	mM	NaAcetat
	10	mM	EDTA
Probenpuffer:	50	%	Formamid, deionisiert
	6	%	Formaldehyd, 37%
	1	x	Gelpuffer, pH 8.0
Loading-Puffer:	40	%	Saccharose
	1	%	SDS
	1	mg/ml	Ethidiumbromid Bromphenolblau

4.5.6.2.2. Northern-Blots (Maniatis, 1982)

Vor dem Transfer werden die Gele 5min in H₂O bidest., dann 20min in 20x SSC geschwenkt. Nach dem Kapillarsog-Transfer wäscht man den Blot in 6x SSC, trocknet ihn kurz zwischen Filterpapier (Whatman 3mm) und bäckst ihn anschließend bei 80°C für 2h unter Vakuum.

4.5.6.2.3. Dictyostelium-RNA-Kolonieblots (Maniak et al., 1988)

Nitrocellulosefilter werden zweimal in H₂O bidest. ausgekocht, um sie RNase-frei und gut benetzbar zu machen. Anschließend kann man *Dictyostelium*-Kolonien entweder von SM-Platten abblotten oder 1x10⁶ Zellen definierter Entwicklungsstadien auftropfen. Die Blots werden auf einen 800µl Tropfen Guanidinium-Lösung gelegt und die Zellen während 5min lysiert. Dann transferiert man den Filter für 5min auf einen Tropfen 20x SSC und bäckst ihn anschließend 2h bei 80°C im Vakuum. Anhaftende Zellreste werden danach durch Waschen in H₂O bidest. entfernt.

4.5.7. Hybridisierungsproben

4.5.7.1. Nicktranslationen

4.5.7.1.1. Herstellen der Probe (Rigby et al., 1977)

Der Nicktranslationsansatz wird gemischt und 45-60 min bei 15°C im Wasserbad inkubiert. Auf Eis gibt man 10 µl Stopplösung zu und zentrifugiert (5min, 2000rpm) den Ansatz durch eine mit TE äquilibrierte G-50 Säule (1ml Feuchtvolumen), um

nichtinkorporierte Nukleotide zu entfernen. Vor der Hybridisierung wird die nicktranslatierte DNA durch 5 minütiges Kochen denaturiert.

Ansatz:	2	µl	10x NT
	4	µl	H ₂ O
	2	µl	Nukleotidmix
	2	µl	DNA (ca. 100-200ng)
	4	µl	DNase-Verdünnung
	1	µl	DNA Polymerase (Boehringer)
	5	µl	³² P-dATP, NEN, NEG 012H, 3000 Ci/mmol)
10x NT Puffer:	0.5	M	Tris/HCl, pH 7.2
	0.1	M	MgSO ₄
	1	mM	DTT
	0.5	mg/ml	BSA (Pentax, Fr. V)
Nukleotid-Mix:	3.3	mM	dCTP, dGTP und dTTP (Boehringer)
DNase-Verdünnung:	10 ⁻⁴		Verdünnung einer Stammlösung von 1mg/ml in 1x NT (Sigma)
Stop-Lösung:	10	mM	Tris/HCl, pH 8.0
	20	mM	EDTA

4.5.7.1.2. Hybridisierung (Mehdy et al., 1983)

Die nach dem Transfer gebackenen Blots werden in Plastiktüten mit Hybridisierungspuffer angefeuchtet und bei 37°C für 1h prähybridisiert. Man nimmt die ³²P-Proben in dem gleichen Puffer auf, gibt sie auf die Blots und schmilzt die Tüten zu. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 37°C. Die Blots werden dann 2x15min mit 2x SSC bei Raumtemperatur und 1h bei 37°C mit Waschpuffer gewaschen, kurz getrocknet und autoradiographiert. Für Rehybridisierung der Blots können die ³²P-Proben durch 2min Kochen in 0.2x SSC, 0.2% SDS, 0.2mM EDTA abgeschmolzen werden.

Hybridisierungslösung:	50	%	Formamid, deionisiert
	2	x	SSC
	1	%	Sarcosyl
	4	mM	EDTA
	0.1	%	SDS
	4	%	Denhardt's 100x
	0.12	M	Phosphatpuffer, pH 6.8

Waschpuffer:	50	%	Formamid, deionisiert
	2	x	SSC
	1	%	Sarcosyl
	2	mM	EDTA
	0.2	%	SDS
	0.12	M	Phosphatpuffer, pH 6.8
100x Denhardt's:	2	%	Ficoll (Pharmacia 400)
	2	%	Polyvinylpyrrolidon (Sigma 40)
	2	%	BSA

4.5.7.2. Riboprobes (Butler & Chamberlin, 1982)

4.5.7.2.1. Herstellen der Probe

Für die *in-vitro*-Transkription müssen alle Materialien RNase frei sein.

Die Template-DNA wird im Polylinker des blue-Gemini-4 Vektors (bGem4) auf der Seite der nicht benutzten Polymerase geschnitten (*EcoRI* für SP6, *HindIII* für T7), um dort die Transkription zu stoppen. Der Verdau wird mit 6.6.2. auf 200µl aufgefüllt und je einmal mit Phenol/Chloroform (Äquiliibriert mit Tris/HCl, pH 8.4) und Ether extrahiert. Anschließend gibt man 20µl 8M LiCl zu und fällt die DNA mit 2 Volumen Ethanol aus. Das Präzipitat wird mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 15µl sterilem 6.6.2 aufgenommen.

Für die Transkription mischt man bei Raumtemperatur:

5	µl	α- ³² P-UTP, Amersham, PB 10163
1	µl	Nukleotidmix (je 5mM CTP, GTP und ATP)
2.2	µl	5x B2 Puffer
1	µl	RNasin (Promega)
0.7	µl	Template-DNA (s.o.)
1.1	µl	RNA-Polymerase SP6 (Promega) oder T7 (Boehringer)

Nach 1h Inkubation bei 40°C gibt man 1µl DNase zu und inkubiert bei 37°C für 5-10min. Dann mischt man den Ansatz mit 130µl phenolgesättigtem 6.6.2. und 3µl tRNA und zentrifugiert die Mischung durch ein 1ml Säulchen mit Sephadex G-50 in H₂O/DEP.

5x Buffer	180	mM	Tris/HCL, pH 7.5
	30	mM	MgCl ₂
	10	mM	Spermidin

5x B2 Puffer:	48	µl	5x Puffer
	2.2	µl	DTT, 1M
	0.5	µl	BSA, 2mg/40µl

Nukleotidmix:	5	mM	GTP
	5	mM	CTP
	5	mM	ATP
	80	μ M	UTP

tRNA: aus *Saccharomyces cerevisiae* (Boehringer), je zweimal mit Phenol und Ether extrahieren, dann Ethanolpräzipitieren und resuspendieren bei einer Konzentration von 5mg/ml.

4.5.7.2.2. Hybridisierung

Die Prähybridisierung und Hybridisierung von Riboprobes erfolgt wie oben beschriebenen in Hybridisierungs-Puffer bei 37°C für Southern-Blots und bei 55°C für Northern-Blots, die Waschschritte erfolgen dann bei den gleichen Temperaturen. Nach der Hybridisierung über Nacht wäscht man die Blots zweimal für 1/2h mit:

Waschlösung:	0.2	x	SSC
	0.2	%	SDS
	0.2	mM	EDTA

4.5.8. Vektorkonstruktionen (Maniatis, 1982)

4.5.8.1. Erzeugung von Blunt-Ends

Für die Ligation wurden Fragmente des RD 10.1 Klons verwendet, die mit blunt-end erzeugenden Restriktionsenzymen aus dem Vektor geschnitten wurden. In den blue-Gemini-4 Vektor wurden diese Fragmente in die *Sma*I-Schnittstelle inseriert; im pDNeoII jedoch stand keine blunt-end-Schnittstelle zur Verfügung, deshalb wurde der Vektor mit *Eco*RI linearisiert und die überhängenden Enden mit Klenow-Fragment aufgefüllt:

10	μ l	PDNeoII (ca. 2 μ g)
4	μ l	10x NT (4.5.7.1.)
4	μ l	Nukleotidmix (4.5.7.1)
4	μ l	dATP (5mM)
2	μ l	Klenow-Fragment (10 units, Boehringer)
18	μ l	H ₂ O bidest.

Die Reaktion läuft 30min bei 22°C ab und wird durch Hitzeinaktivierung des Klenow-Fragments (5min, 75°C) gestoppt. Die DNA wird mit Ethanol gefällt, abzentrifugiert, einmal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10 μ l TE aufgenommen.

4.5.8.2. Dephosphorylierung

Beide Vektoren werden vor der Ligation dephosphoryliert, um Vektor-Vektor Assoziationen zu unterdrücken:

10	µl	Vektor (ca. 2µg)
5	µl	10x CIP-Puffer
33	µl	H ₂ O
2	µl	CIP (Calf Intestine Phosphatase, 0.25U/ml, 1:100 verdünnt, Boehringer)

Die Reaktion läuft	15	min	bei 37°C
	15	min	bei 56°C
	15	min	bei 37°C
	15	min	bei 56°C

Anschließend fügt man 40µl H₂O, 10µl STE und 5µl 10% SDS zu und hitzeinaktiviert die Phosphatase für 15min bei 68°C. Das Enzym wird durch zwei Phenolextraktionen, gefolgt von zwei Chloroformextraktionen aus dem Ansatz entfernt, anschließend wird die DNA mit Ethanol gefällt, einmal mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet.

10x CIP-Puffer:	0.5	M	Tris/HCl, pH 9.0
	10	mM	MgCl ₂
	1	mM	ZnCl ₂
	10	mM	Spermidin (Sigma)

STE:	10	mM	Tris/HCl, pH 8.0
	100	mM	NaCl
	1	mM	EDTA

4.5.8.3. Ligation

Die Ligation erfolgte mit $\frac{1}{20}$ des pDNeoII Vektor-Ansatzes, $\frac{1}{10}$ des bGem4 Vektors und je 5µl der beiden *DraI-EcoV*-Fragmente des RD10.1 Klons (ca. 0.2µg). Die Reaktion lief über Nacht bei Raumtemperatur ab, die Hälfte des Ansatzes wurde zur Transformation von *E. coli* verwendet (MC1061 für pDNeoII, JM109 für bGem4, vergl. 4.5.2).

5	µl	<i>DraI-EcoV</i> Fragment
1	µl	Vektor DNA
9	µl	H ₂ O
2	µl	10x Ligasepuffer
2	µl	ATP (10mM)
1	µl	T4 Ligase (Boehringer)

10x Ligasepuffer:	0.5	M	Tris/HCl, pH 7.4
	0.1	M	MgCl ₂
	0.1	M	DTT
	10	mM	Spermidin
	1	mg/ml	BSA

4.5.9. Sequenzierung (Sanger et al. 1977)

4.5.9.1. Denaturieren der Doppelstrang-DNA

2µg Plasmid-DNA aus einer Promega-Präparation werden in 40µl in Denaturierungspuffer 15min bei Raumtemperatur inkubiert, nach Zugabe von 4µl 2M NH₄Acetat, pH 4.6 mit 110µl eisgekühltem Ethanol für 15min ausgefällt, abzentrifugiert, einmal mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet.

10x Denaturierungspuffer:	0.2	M	NaOH
	0.2	M	EDTA

4.5.9.2. Anhybridisieren des Primers

In 16µl Annealing-Puffer werden 2µg denaturiertes Plasmid mit 5pmol Oligonukleotidprimer (4.5.3., 4.5.5.3.) für 15min bei 37°C und für 5min auf Eis inkubiert.

10x Annealing-Puffer:	70	mM	Tris/HCl, pH 7.5
	70	mM	MgCl ₂
	300	mM	NaCl
	100	mM	DTT
	1	mM	EDTA

4.5.9.3. Sequenzreaktion

Man mischt 4 Reaktionsansätze aus 2µl G-, bzw. A-, T-, C-Mix und je 3.9µl Primer-Mix (4.5.9.2.), je 2µl Klenow-Mix und inkubiert 15min bei 45°C. Anschließend gibt man 2µl Chase-Mix zu, inkubiert für weitere 15min bei 45°C, fügt 3µl Farbmarker zu und denaturiert die Proben für 15-20min bei 80°C.

Klenow-Mix:	2	µl	Klenow-Polymerase (5U/ml)
	2	µl	³⁵ S-ATP (10 mCi/µl)
	4.5	µl	H ₂ O bidest.

Nukleotid-Mischungen in Annealing-Puffer (Boehringer):

	A-Mix	C-Mix	G-Mix	T-Mix	
dTTP	100	100	100	5	mM
dCTP	100	10	100	100	mM
dGTP	100	100	5	100	mM
ddGTP	-	-	120	-	mM
ddCTP	100	-	-	-	mM
ddATP	50	-	-	-	mM
ddTTP	-	-	-	250	mM

Chase-Mix: 0.125 mMol dNTP (N = A + T + G + C)

Farbmarker: 0.1 % Xylen Cyanol FF
 0.1 % Bromphenolblau
 10 mM EDTA
 in Formamid

4.5.9.4. Harnstoff-Gradienten-Acrylamid-Gele (Biggin et al., 1983)

Man setzt 50ml Ober- und 10ml Untergellösung an, indem man die Stammlösungen mit 25% APS und TEMED zu Endkonzentrationen von 0.125% APS und 0.075% TEMED mischt. Man saugt 10ml Obergellösung und 5ml Untergellösung in eine Pipette und durchmischt sie mit einigen Luftblasen. Dieser "Gradient" wird zwischen 40cm hohe, silanisierte Glasplatten gegossen und mit dem Rest der Obergellösung überschichtet. Nach 2h ist die Polymerisation beendet und man kann mit Haifischzahnkämmen die Hälfte der Sequenzreaktionsansätze auftragen. Nach dem Lauf (3h bei 40 Watt) werden die Glasplatten auseinandergenommen, das Gel 30min in 10% Essigsäure fixiert, in Wasser gespült und ca. 1h bei 80°C getrocknet. Anschließend werden Kodak Xomat-S Filme über Nacht bei Raumtemperatur exponiert.

Acrylamid-Stammlösung: 19 % Acrylamid
 1 % Bisacrylamid

10x TBE: 0.89 M Tris, pH 8.3
 0.89 M Borsäure
 0.1 M EDTA

Obergel-Stock: 6 % Acrylamid 19:1
 0.5 x TBE
 7.7 M Harnstoff

Untergel-Stock: 5 % Acrylamid, 19:1
 6 x TBE
 7.7 M Harnstoff

4.5.10. Transformation von *Dictyostelium* (Nellen et al., 1984)

4.5.10.1 Vorbereiten der Zellen

Eine AX2-Kultur wird bis zu einer Dichte von $2\text{-}3 \times 10^6$ Zellen/ml angezogen. 10ml dieser Suspension pipettiert man in Falcon Optolux-Platten und erlaubt den Zellen für mindestens 1h an die Platte anzuhaften. Man bringt eine Markierung an einer Stelle der Platte an, von der aus alle Medienwechsel erfolgen, um den Verlust an Zellen möglichst niedrig zu halten. Nach dem Absitzen der Zellen wird das HL5-Medium entfernt und durch 10ml MES-Medium ersetzt. Man läßt die Zellen erneut einige Stunden im MES-Medium absitzen, bevor die eigentliche Transformation beginnt.

MES-Medium:	10	mM	MES, pH 7.1
	1	%	Glucose
	1	%	Proteosepepton
	0.5	%	Hefeextrakt
	40	µg/ml	Ampicillin

4.5.10.2. Bildung des DNA-Calcium- PO_4 -Präzipitats

12µg des Transformationsvektors werden in 600µl 1x HBS-Puffer verdünnt. Unter Vortexieren tropft man langsam 38µl einer 2M CaCl_2 -Lösung zu und läßt zur Ausbildung des DNA- $\text{Ca}^{++}/\text{PO}_4$ -Komplexes die Mischung noch 25min bei Raumtemperatur stehen.

2x HBS:	40	mM	HEPES, pH 7.1
	275	mM	NaCl
	8.5	mM	KCl
	1.8	mM	NaH_2PO_4
	2	%	Dextrose
			sterilfiltrieren, 4°C

4.5.10.3. Transformation

Man nimmt das MES-Medium vollständig ab und träufelt die 638µl DNA-Präzipitat gleichmäßig auf den Zellrasen. Die Platten werden abgedeckt und 25min inkubiert. Anschließend gibt man 10ml MES-Medium zu, läßt die Zellen 3-6h stehen und setzt die Zellen anschließend einem Glycerinschock aus. Dazu tauscht man das MES-Medium gegen 2.5ml 18% Glycerin aus. Nach 7-9min ersetzt man das Glycerin durch HL5. Nach weiteren 3-12h werden die Zellen unter Selektionsdruck gesetzt indem man das HL5-Medium austauscht gegen HL5-Medium, dem 20mg/ml Geneticin (G418) beigemischt wurde. Nach ca. 8 Tagen wachsen die ersten kleinen Kolonien heran.

18% Glycerin:	3	ml	60% Glycerin, autoklaviert
	5	ml	2x HBS
	2	ml	H ₂ O

Antibiotika:	20	mg/ml	G418 Stammlösung
	50	mg/ml	Ampicillin Stammlösung

4.5.10.4. Klonieren

Zum Klonieren werden die Zellen von der Transformationsplatte abgeschwemmt und ein Großteil der Amöben eingefroren. Der Rest wird auf 5000 Zellen/ml verdünnt und davon je 200µl auf SM-Platten mit *Klebsiella aerogenes* ausgestrichen. Nach 3-4 Tagen wachsen ca. 200 Klone pro Platte an, die dann zum Testen auf das 56-Raster überimpft werden (4.2.4.). Nach dem Testen interessante Klone werden nachkloniert.

4.6. ABKÜRZUNGEN

APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovine Serum Albumin
cAdPK	cAMP dependent Protein Kinase
cAMP	Adenosin-3',5'-cyclic-monophosphat
cAMP-S	Adenosin-3',5'-cyclic-phosphorothioat
cGMP	Guanosin-3',5'-cyclic-monophosphat
cNA	contact sites A
2'd-cAMP	2'deoxy-Adenosin-3',5'-cyclic-monophosphat
DABCO	1,4-Diazobicyclo (2,2,2)-Octan
DEP	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-acetat
FCS	Fetales Kalberserum
FITC	Fluorescein isothiocyanat
γ -ATP	γ -32P-Adenosin-triphosphat
35 S-dATP	deoxy-Adenosin-5' α -(35 S) triphosphate
IgG	Immunglobulin der G-Klasse
IPTC ₁	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
LB	Luria Bertani Medium, Seite 38
KK ₂	Kaliumphosphatpuffer, Seite 33
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin-Medium, Seite 29
HEPES	N-2 Hydroxyethylpiperazin-N-2 ethansulfonsäure
HT	Hypoxanthin-Thymidin-Medium, Seite 29
LPS	Lower Pad Solution, Seite 18
NA	Normalagar, Seite 17
N-P-Puffer	Natriumphosphatpuffer, pH 8,0, Seite 31
NM	Normalmedium, Seite 27
NP 40	Nonidet P 40
NT-Puffer	Nicktranslationspuffer, Seite 46
mAb	monoclonal Antibody
MES	3'-N-Morpholinoethansulfonsäure
MMNG	N'-Methyl-N'-Nitro-N'-Nitrosoguanidin
MOPS	3'-Morpholinopropansulfonsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline, pH 7,2, Seite 31
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluorid
PSI	Pounds per Square Inch
R	regulatorische Untereinheit der cAdPK
R.D	R aus <i>Dictyostelium discoideum</i>
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SA-M	Monoklonaler Antikörper aus Schaf gegen Maus IgG
Sarcosyl	N-Lauryl-Sarcosylnatriumsalz
S.D.S	Sodium-dodecylsulfat
SM	Standard Medium, Seite 17
SPF	Special Pathogen Free
SSC	Sodiumchloride, Sodiumcitrate, Seite 44
TE	Tris/EDTA, Seite 40
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
X-Gal	5-Bromo 4-Chloro 3-Indolyl β -Galactopyranosid

5. PROTEINCHARAKTERISIERUNG UND ANTIKÖRPER

5.1. ERGEBNISSE

5.1.1. Reinigung der Regulatorischen Untereinheit

5.1.1.1. Zellmaterial

Aus der Literatur war bekannt, daß die Regulatorische Untereinheit ein entwicklungs-reguliertes Protein ist, das in späten Phasen der Entwicklung einen fünffachen Anstieg an Aktivität zeigt. In Immunoblot-Analysen verschiedener Entwicklungsstadien (4.1.4.) konnten nach Detektion mit ^{125}J -mAB 80-386-10 keine mengenmäßigen Unterschiede zwischen Filter- und Suspensions-entwickelten Zellen festgestellt

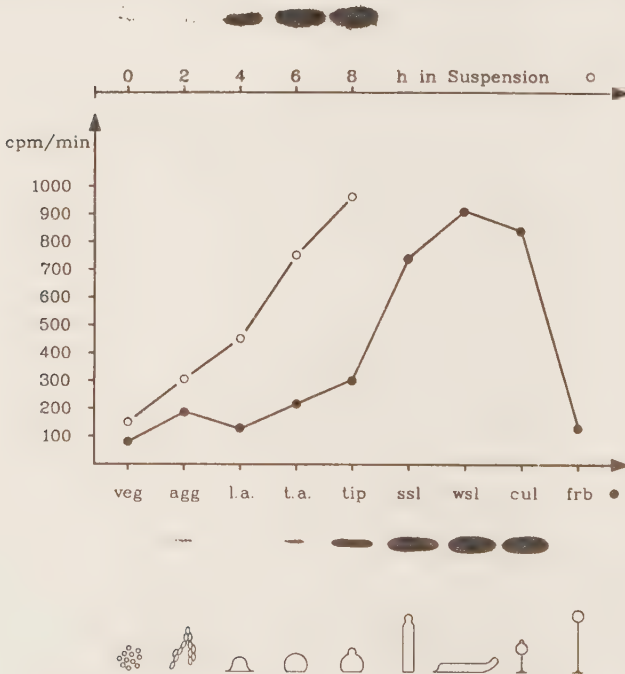


Abb. 6:

Anstieg der Regulatorischen Untereinheit während der Suspensions- (○) und Filter-Entwicklung (●). Die Quantifizierung durch Zählen der ^{125}J -markierten Banden auf Immunoblots mit mAB 80-386-10, veg = vegetative Amöben, agg = aggregierende Zellen, la = "loose aggregates", ta = "tight aggregates", tip = "tipped aggregates", ssl = "standing slugs", wsl = "migrating slugs", cul = Kulmination, frb = Fruchtkörper.

werden (Abb. 6). Deshalb wurden für die Aufreinigung im Gegensatz zu Protokollen aus der Literatur (de Gunzburg & Veron, 1982; Majerfeld et al., 1984; Rutherford et al., 1984) Zellen verwendet, die sich für 12-14h in Suspension entwickelt hatten, da sie erstens in großen Mengen leichter zu handhaben sind als Filter-entwickelte Zellen und zweitens der Entwicklungsanstieg früher erfolgt.

Für die Präparation wurden Zellen aus drei 10-Liter-Fermentern aufgearbeitet (ca. $1.5 \cdot 3 \cdot 10^{11}$ Zellen, 300-500g Naßgewicht, (4.2.5.).

5.1.1.2. Reinigungsschritte (4.2.5.)

Als cytoplasmatisches Protein befindet sich die Regulatorische Untereinheit nach der Lyse im löslichen Überstand der 100000g Zentrifugation. Da das Protein wegen seines pI von 6.4 bei dem pH des DE-Puffers von 7.2 als Anion vorliegt, bindet es an die DEAE-Cellulose und kann mit einem Salzgradienten von der Säule eluiert werden. Das Maximum der cAMP-Bindeaktivität eluiert bei einer Leitfähigkeit von 40mS, das entspricht 80mM NaCl im Säulenpuffer. Die Elution beginnt sofort nach Anlegen des Gradienten und ist bei 150mM NaCl (75mS) vollständig beendet (Abb. 7).

Die cAMP-Bindefraktionen werden gepoolt und durch Affinitätschromatographie an einer cAMP-Sepharose-Säule weiter aufgereinigt. Nach einem Salzwasschschrift und Elution mit 1mM cAMP erhält man stark angereicherte Fraktionen (Abb. 8). Eine

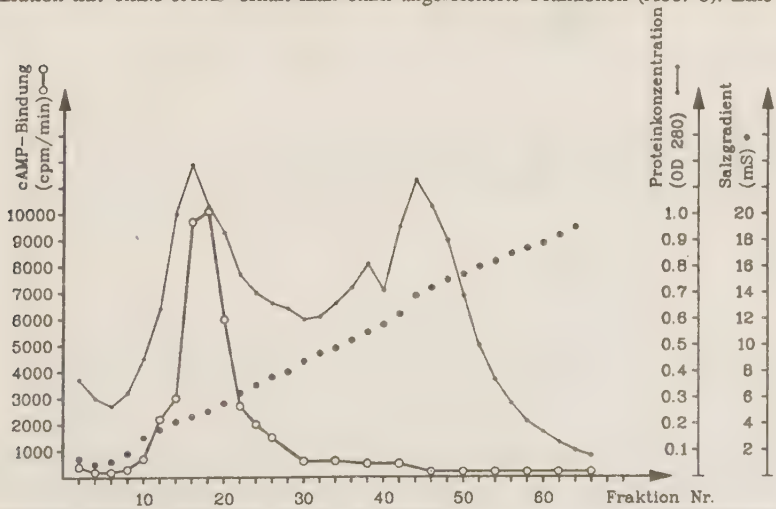


Abb. 7:
Profil einer DEAE-Säule bei pH 7.2. Angegeben sind die cAMP-Bindeaktivität (○), die Proteinkonzentration (●) und der Salzgradient (○).

Mengenabschätzung der R-Untereinheit in den angereicherten Fraktionen erfolgte durch Scannen von silbergefärbten SDS-PAGE-Gelen und Vergleich der Bandenintensität mit der von Eichproteinen bekannter Menge. Die Ausbeute aus 30 Liter Suspensionskultur betrug ca. 300µg.

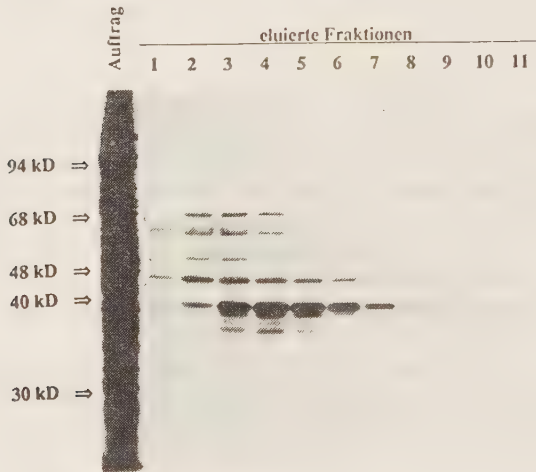


Abb. 8:

Anreicherung der Regulatorischen Untereinheit in den Fraktionen der cAMP-Affinitätssäule, Silberfärbung eines 10% SDS-PAGE-Gels.

5.1.2. Fusionsergebnis

Um Antikörper gegen die Regulatorische Untereinheit zu erhalten, wurden Fraktionen der cAMP-Affinitätssäule zur Immunisierung von Mäusen verwendet. Jedes Tier erhielt insgesamt 100µg R-Untereinheit nach den Immunisierungsprotokollen unter 4.3.2. Die nach der Fusion (4.3.3.) angewachsenen Klone wurden indirekt im Immunoblot getestet (4.3.3.3.): Die erste Selektion erfolgte im Test gegen Zellhomogenate; die Überstände aller positiven Klone, auch solcher, die Banden > 40kD erkannten, wurden anschließend zur Verifizierung der Spezifität gegen Fraktionen der cAMP-Affinitätssäule getestet, in denen die Regulatorische Untereinheit stark angereichert war. Neben dem bereits vorhandenen mAb 80-386-10 wurden in 4 Fusionen weitere monoklonale Antikörper gefunden, die sich in drei Gruppen unterteilen lassen.

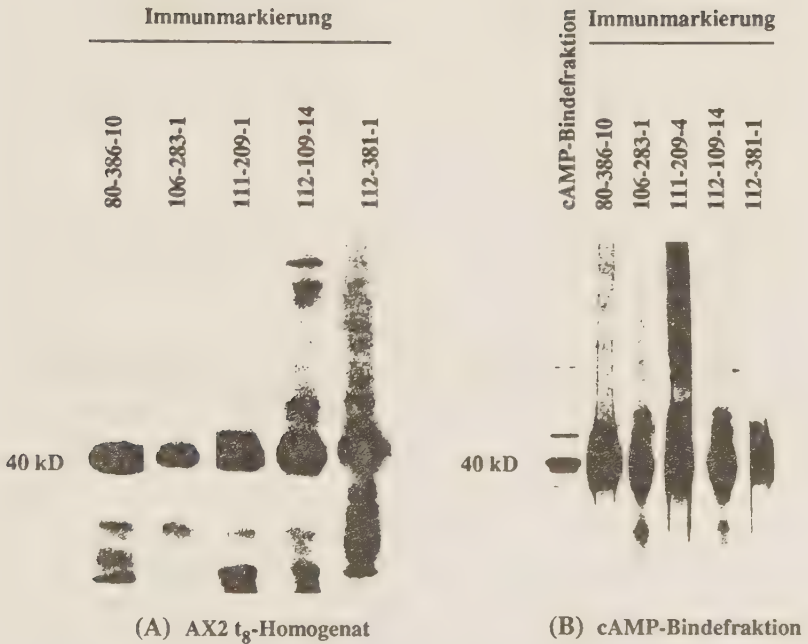


Abb. 9:

Monoklonale Antikörper der Klasse 1 gegen das 40kD cAMP-Bindeprotein, getestet gegen (A) Homogenat von AX2 t₈-Zellen, (B) angereicherte 40kD Regulatorische Untereinheit.

1. Klasse: (106-283-1, 111-209-4, 112-109-14, 112-381-1, Abb. 9)
erkennt im Homogenat und in cAMP-Bindefraktionen ein Protein mit Molekulargewicht 40kD.
2. Klasse: (112-293-21, 112-296-2, 112-308-2, 112-442-8, 112-461-18, Abb. 10)
erkennt im Homogenat und in cAMP-Säulenfraktionen ein 48kD Protein.
3. Klasse: (112-4-15, 112-315-27, Abb. 10)
Im Homogenat ist die Hauptaktivität der Antikörper gegen eine Doppelbande von 50/56kD gerichtet, in den angereicherten Fraktionen erkennen diese Antikörper jedoch die Regulatorische Untereinheit von 40kD.

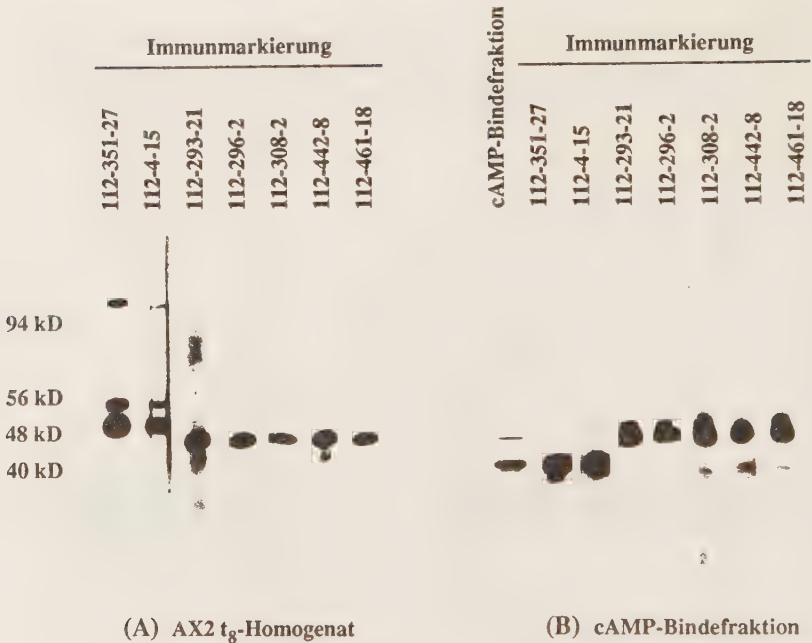


Abb. 10:

Monoklonale Antikörper der Klasse 2 (Spur 4 bis 8) und Klasse 3 (Spur 2, 3) getestet gegen (A) Homogenat von AX2 tg-Zellen, (B) angereicherte Proteine der cAMP-Affinitätsäule.

5.1.3. Photoaffinitätsmarkierung

5.1.3.1. Methodisches zur Photoaffinitätsmarkierung

Das Aufreinigungsprotokoll und das apparente Molekulargewicht des 40kD Proteins legen die Annahme nahe, daß es sich dabei um die Regulatorische Untereinheit handelt. Um die Spezifität der Antikörper gegen R eindeutig zu belegen, war jedoch noch ein funktioneller Test nötig.

Da nach der Affinitätsäule die eluierten Proteine bereits mit 1mM cAMP beladen sind, kann man in solchen Präparationen keine cAMP-Bindung mehr nachweisen. Das Entfernen des cAMP durch Dialyse oder eine zweite DEAE-Säule führten zu enormen Verlusten an Protein, die Wiederherstellung der cAMP-Bindeaktivität war nicht zufriedenstellend. Deshalb wurde als alternativer Nachweis funktioneller Eigenschaften des 40kD Proteins die Photoaffinitätsmarkierung (4.2.5.) von cAMP-freien Proben gewählt, um die Identität mit der Regulatorischen Untereinheit zu belegen.

Zum Optimieren der Photoaffinitätsmarkierung mit 8-N₃-cAMP wurden DEAE-Säulenfraktionen aus dem Maximumsbereich der cAMP-Bindeaktivität verwendet. Folgende Bedingungen wurden anschließend standardmäßig eingehalten:

- 100nM 8-N₃-cAMP erwiesen sich als ausreichend
- 5min Bestrahlung bei 256nm mit 2cm Abstand zur Probe ergaben maximale Markierung

Unter diesen Bedingungen wird als einziges ein 40kD Protein spezifisch mit ³²P markiert: Die Markierung ist vollständig kompetierbar mit 10μmol cAMP und reduzierbar mit 10μmol cGMP, nicht jedoch mit AMP und ATP (Abb. 11). Dieses Protein läßt sich durch 2D-Elektrophorese (4.2.2.) in 3 Isoformen auflösen (Abb.), von denen die sauerste manchmal nur schwer sichtbar ist (In der Literatur sind 2 Isoformen der Regulatorischen Untereinheit beschrieben, Leichtling et al., 1982; Majerfeldt et al., 1984).

Nur nach Überexposition des Films sichtbare Banden von 56, 68 und 95kD sind nicht mit cAMP kompetierbar, der Label der 56kD Bande wird durch ATP kompetiert, ist also nicht spezifisch für cAMP. Es liegt damit für keines dieser Proteine Evidenz für eine cAMP-spezifische Bindung vor.

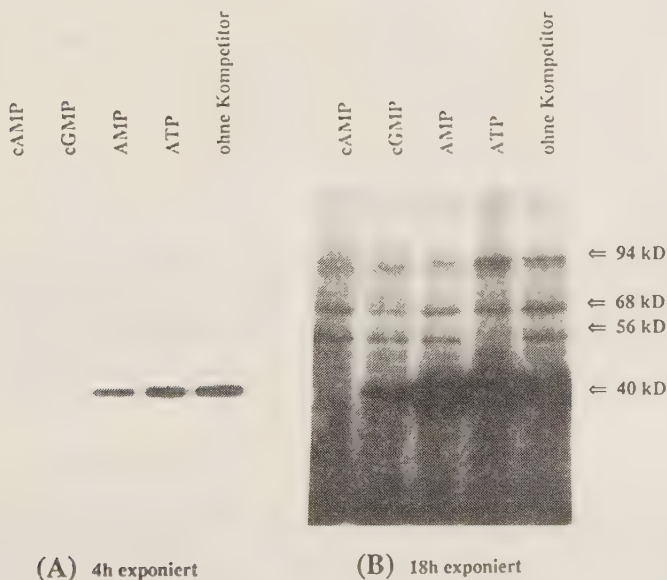


Abb. 11:
Photoaffinitätsmarkierung einer Fraktion der DEAE-Säule (maximale cAMP-Bindeaktivität im Isotopenbindungsassay (4.2.5.1.)) unter Zugabe von 1mM cAMP, cGMP, AMP und ATP als Kompetitoren. (A) 4h Expositionszeit, (B) 18h Expositionszeit.

5.1.3.2. Identität des 40kD Proteins mit der Regulatorischen Untereinheit

Die Quantifizierung der oben erwähnten Konkurrenz der Markierung durch Zugabe kalter Nukleotide wurde genutzt, das 40kD Protein weiter zu charakterisieren: Die Konkurrenz ist halbmaximal bei 30nmol cAMP und 5µmol cGMP (Abb. 12)

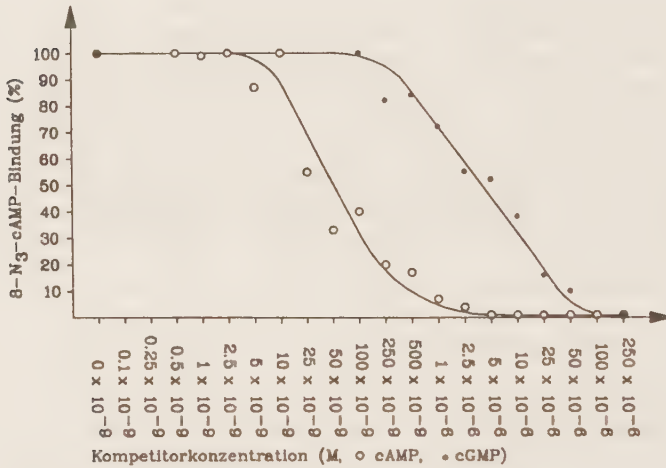


Abb. 12:

Kompetition der Photoaffinitätsmarkierung des 40kD cAMP-Bindeproteins durch cAMP und cGMP zur Bestimmung der Affinitäten. Für die cAMP-Kompetition wurden die Cytoplasmafraktion von Zellhomogenat nach Passage durch eine Sephadex-G25-Säule verwendet, für die cGMP-Kompetition eine DEAE-Säulenfraktion mit hoher cAMP-Bindeaktivität. Nach SDS-PAGE der markierten Proben wurden die Gele fixiert und getrocknet. Die Position des 40kD Proteins wurde auf Autoradiogrammen identifiziert, dieser Bereich des Gels ausgeschnitten und im β -Counter gezählt.

Der Isoelektrische Punkt des 40kD Proteins von 6.4 wurde durch Ausmessen des pH-Gradienten in den Fokussiergelen mit einer Halbmikro-pH-Elektrode bestimmt und durch einen internen Standard bestätigt: das Membranprotein csA, das sich wegen unterschiedlich starker Sulfatierung in eine Reihe von Komponenten mit IPs von 4.6-5.2 auftrennen läßt, wurde zu den cytoplasmatischen Proteinen zugemischt und auf den Blots mit mAb 33-294-17 nachgewiesen. Als zweiter Marker wurden die vier Isoformen des Discoidin I verwendet.

Zusammenfassend kann man sagen, daß folgende Eigenschaften des 40kD Proteins mit Angaben aus der Literatur für die Regulatorische Untereinheit übereinstimmen, beide Protein also identisch sind:

1. Molekulargewicht von 40kD (Leichtling et al., 1982)
2. Isoelektrischer Punkt von ca. 6.4 (Leichtling et al., 1982; Majerfeldt et al., 1984)
3. cAMP-Bindeaktivität auf der Affinitätssäule (Majerfeldt et al., 1984)
4. cAMP-Bindeaktivität in der Photoaffinitätsmarkierung (Wallace & Frazier, 1979)
5. Dissoziationskonstante von 30nmol für cAMP (de Wit et al., 1982)
6. Dissoziationskonstante von 5µmol für cGMP (Wallace & Frazier, 1979; Cooper et al., 1980; de Gunzburg & Veron, 1982; de Wit et al., 1982)

5.1.3.3. Spezifität der Antikörper für die Regulatorische Untereinheit

Nach der Photoaffinitätsmarkierung von DEAE-Säulenfraktionen wurden die Proben zweidimensional aufgetrennt, transferiert und zur Detektion des ^{32}P autoradiographiert. Anschließend wurden die Blots mit IgG der Antikörper der Klasse 1 inkubiert, die Bindung durch Streptavidin-Biotin-verstärkte Peroxidase-Reaktion nachgewiesen (um nicht mit der ^{32}P -Strahlung der Photoaffinitätsmarkierung kompetieren zu müssen, 4.3.5.3) und die Spots verglichen (Abb. 13):

1. Alle drei photoaffinitätsmarkierten Isoformen der Regulatorischen Untereinheit werden von den Antikörpern der Klasse 1 erkannt.
2. Im Vergleich zur Photoaffinitätsmarkierung ist ein weiterer Spot in der Antikörperfärbung nicht erkennbar. Man erwartet, daß das kovalente Anheften des geladenen 8-N₃-cAMP die Mobilität der Proteine in der isoelektrischen Fokussierung verändert. Unter dieser Annahme müsste nicht photoaffinitätsmarkiertes Protein auf der basischen Seite der ^{32}P -Spots nachweisbar sein. Das Fehlen eines zusätzlichen, nicht markierten Spots in der Antikörperfärbung zeigt dann, daß die Regulatorische Untereinheit quantitativ mit 8-N₃-cAMP reagiert hat.

5.1.3. Charakterisierung der R-Antikörper

Da alle fünf R-Antikörper im 2D Blot das gleiche Muster ergeben, also keine verschiedenen Modifikationen der Regulatorischen Untereinheit erkennen, wurden weitere Versuche unternommen, unterschiedliche Epitopspezifitäten der mAb zu identifizieren. Dazu wurden zum einen Kompetitionsanalysen, zum anderen Immunpräzipitationen angewandt. Da die Antikörper mit Immunoblot-Tests selektiert wurden, erkennen alle mAb SDS-denaturiertes Material. Ihre Verschiedenheit zeigt sich jedoch im Vergleich ihrer Fähigkeit zur Immunpräzipitation, d.h. ihrer Reaktion mit "nativem" Protein (Abb. 14).

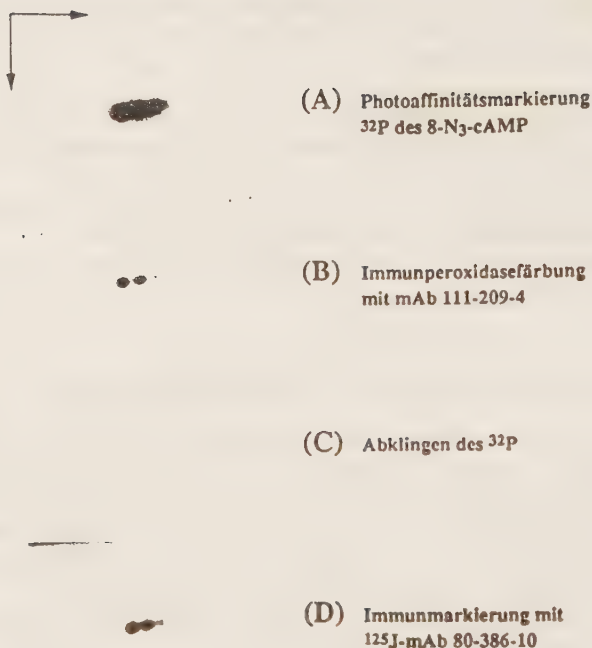


Abb. 13:

Vergleich von Photoaffinitäts- und Immunmarkierung mit mAb 80-386-10 und 111-209-4. Eine DEAE-Fraktion mit hoher cAMP-Bindeaktivität wurde mit ^{32}P -8- N_3 -cAMP markiert, zweidimensional nach pI und Molekulargewicht aufgetrennt, transferiert und die Regulatorische Untereinheit durch Autoradiographie detektiert (A). Zum Vergleich mit den mAb-Spezifitäten wurden anschließend Immunoperoxidasefärbung mit 111-209-4 (B) und nach Abklingen des ^{32}P (C) direkte Markierung mit ^{125}J -mAb 80-386-10 (D) durchgeführt. Mit allen mAb wurden identische Muster erhalten.

1. Nur die mAb 106-283-1 und 111-209-4 präzipitieren die Regulatorische Untereinheit nahezu quantitativ aus der Lösung ($5\mu\text{g}$ IgG pro 10^7 Zellen).
2. Die mAb 80-386-10 und 112-381-1 erfassen nur einen Teil des R-Proteins; dieser Anteil kann auch durch Erhöhen der IgG-Konzentration oder der Protein-A-Sepharose-Menge nicht vergrößert werden. 80-386-10 erkennt wahrscheinlich nur denaturiertes Protein, da die Effizienz der Präzipitation durch Vorbehandlung der Proben mit SDS deutlich gesteigert werden konnte.
3. Der mAb 112-109-14 ist in der Immunpräzipitation vollständig inaktiv.

P	Ü	Immunpräzipitation
		Kontrolle ohne IgG
		80-386-10
		106-283-1
		111-209-4
		112-109-4
		112-381-1

Abb. 14:

Immunpräzipitationen mit 5µg IgG aus der Cytoplasmafraktion des Zellhomogenats. P = Pellet, Ü = Überstand der Präzipitation mit ProteinA-Sepharose-Beads.

Für die Kompetitionstests wurden ^{125}J -markierte Antikörper (1×10^6 cpm/ml) mit 40µg/ml unmarkiertem IgG gemischt und übernacht bei Raumtemperatur mit Blotstreifen inkubiert, auf denen AX2-tg-Homogenat von 1×10^6 Zellen aufgetrennt waren. Die Inhibition des ^{125}J -Labels der Regulatorischen Untereinheit ist in Abb. 14 dargestellt. In diesem Assay zeigten die Antikörper deutlich verschiedenes Verhalten (Abb. 15).

1. Der mAb 80-386-10 erkennt ein Epitop, das stark verschieden ist von denen der anderen Antikörper, er wird von keinem der anderen mAb inhibiert und interferiert selbst nicht mit ihrer Bindung.
2. Die mAb 106-283-1 und 112-381-1 kompetieren sich gegenseitig in beiden Richtungen. Sie haben also vergleichbare Spezifitäten, obwohl sie aus verschiedenen Fusionen stammen.
3. Der mAb 111-209-4 interferiert mit 106-283-1 und 112-381-1, ist aber von diesen verschieden bezüglich seiner Wechselwirkung mit dem mAb 112-109-14. 112-109-14 kompetiert die mAb 106-283-1- und 112-381-1, nicht jedoch 111-209-4

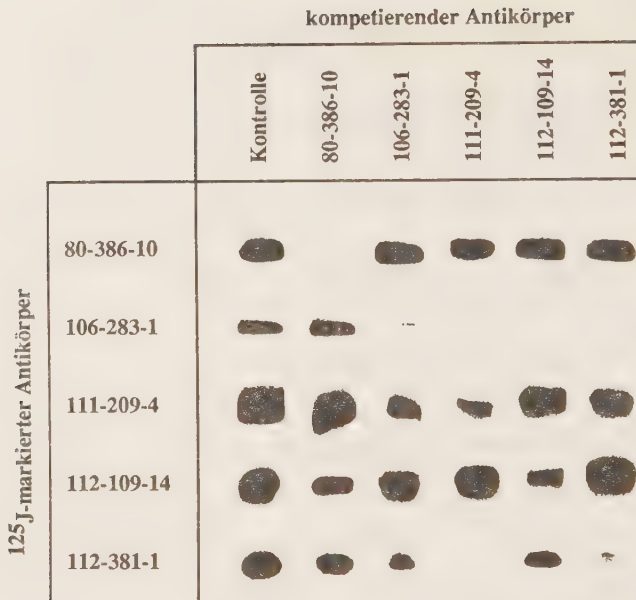


Abb. 15:
Kompetition der ^{125}J -mAb-Markierung der Regulatorischen Untereinheit durch Mischen mit nicht-jodierten mAb.

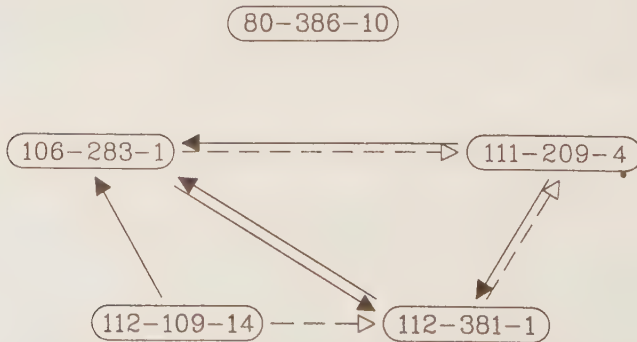


Abb. 16: Schematische Darstellung der kompetierenden Wechselwirkung der mAb.

Die Tatsache, daß die Inhibitionswirkungen nicht in beiden Richtungen gleich stark sind, kann man durch unterschiedliche Affinitäten der Antikörper erklären, z.B. weist 106-283-1 eine gegenüber den anderen Antikörpern deutlich niedrigere Affinität auf.

Hervorzuheben ist die Tatsache, daß die beiden mAb, die sich im Kompetitionstest nahezu identisch verhalten (106-283-1 und 112-381-1), dennoch bei der Immunpräzipitation verschieden sind.

Man kann zusammenfassen, daß die fünf R-spezifischen Antikörper, die aus vier unabhängigen Fusionen stammen, unterschiedliche, aber wohl überlappende Epitope (Ausnahme 80-386-10) erkennen, die nur z.T. im nativen Protein zugänglich sind.

Bemerkenswert ist die Tatsache, daß die gefundenen Antikörper zum größten Teil aus mit Alugel S als Adjuvans immunisierten Mäusen stammen (Fusionen 80, 106 und 112). Aus den mit Freund's Adjuvans immunisierten Mäusen (79, 105, 111) stammt nur der eine Antikörper 111-209-4. Solche unterschiedlichen Effizienzen der Adjuvantien in der Stimulation der Immunantwort scheinen nicht außergewöhnlich und je nach Antigen verschieden ausgeprägt zu sein.

5.1.5. Keine Hinweise auf weitere lösliche cAMP-Bindeproteine

5.1.5.1. Discoidin

In anfänglichen Präparationen der Regulatorischen Untereinheit tauchten in dem Eluat der cAMP-Affinitätssäule zwei deutliche Kontaminationen von 30 und 48kD auf. Nach Immunisierung mit solchen Fraktionen waren in der 80. Fusion monoklonale Antikörper gegen das 30kD Protein (80-52-13) und die Regulatorische Untereinheit (80-386-10) gefunden worden. Die Ko-Aufreinigung und die Tatsache, daß der R-mAb 80-386-10 oft Kreuzreaktionen im 30kD Bereich aufweist, ließen es möglich erscheinen, daß es sich bei dem 30kD Protein um ein nicht identifiziertes cAMP-Bindeprotein handelte. Daher wurde der mAb 80-52-13 benutzt, dieses Protein zu charakterisieren.

Die Hauptmasse des 30kD Proteins aus dem 100000g Überstand sammelt sich im Durchlauf der DEAE-Säule, relativ wenig erscheint in frühen Fraktionen der Salzelution (bis max. 60mM NaCl) und damit im Pool der cAMP-Bindefraktionen. Dieser Anteil bindet unvollständig an die Affinitätssäule, erscheint dann in allen Waschschritten und eluiert nicht komplett mit cAMP. Aufgrund des chromatographischen Verhaltens und der Tatsache, daß es sich um ein in Suspensionskultur nicht entwicklungsreguliertes Massenprotein handelt (Daten ohne Abbildung), wurde geprüft, ob es sich um das Lektin Discoidin (Simpson et al., 1974; Poole et al., 1981; Devine et al., 1982) handelt. Der mAb 80-52-13 wurde erstens in Immunoblots mit gereinigtem Discoidin I und II getestet (Abb. 17) und zweitens in 2D Blots von gereinigtem Discoidin und Zellhomogenaten (Abb. 18) mit der Markierung eines polyklonalen anti-Discoidin-Serums aus Kaninchen verglichen.

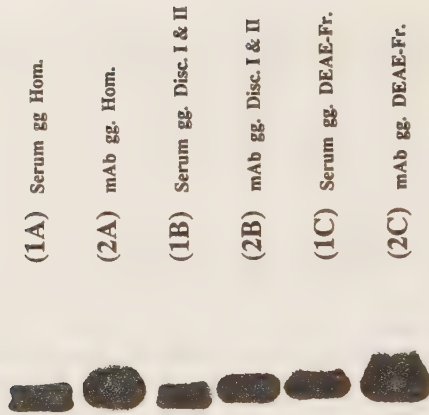


Abb. 17:

Vergleich von polyklonalem Kaninchen-Serum gegen Discoidin I und II (1) mit dem mAb 80-52-13 (2) in Immunoblots mit (A) AX2-Zellhomogenat, (B) gereinigtem Discoidin I und II, (C) einer früh eluierten DEAE-Säulenfraktion (40mM NaCl).

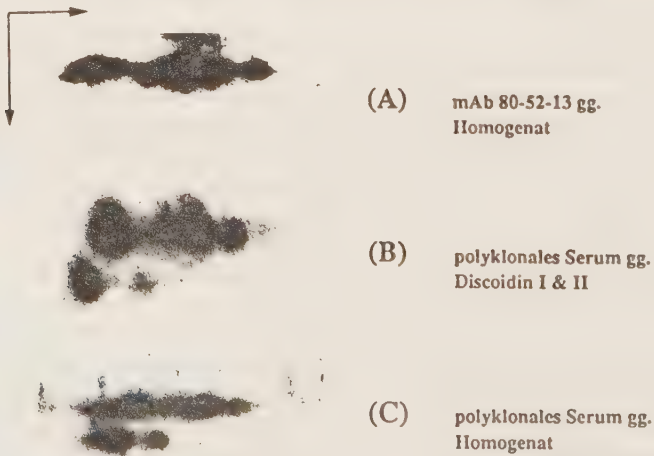


Abb. 18:

Vergleich von polyklonalem Kaninchen-Serum gegen Discoidin I und II (B, C) mit dem monoklonalen Antikörper 80-52-13 (A) auf 2D-Blots mit (A, C) AX2-Zellhomogenat, (B) gereinigtem Discoidin I und II.

Beide Tests zeigten deutlich, daß 80-52-13 Discoidin-spezifisch ist, aber nur die Bande des Discoidin I erkennt, die höhermolekular ist als Discoidin II. Damit war klar, daß die Galaktose-Bindeaktivität des Discoidins für die Bindung an die cAMP-Säule verantwortlich ist, die durch Interaktion mit der Säulenmatrix (Galaktosepolymer) zustande kommt.

5.1.5.2. Das 48kD Protein in Fraktionen der cAMP-Säule

Das 48kD Protein befindet sich als lösliches Protein im 100000g Überstand. Es bindet vollständig an die DE52-Säule und eluiert während des gesamten Salzgradienten (bis 350mM NaCl getestet). Die größte Menge befindet sich in den gleichen Fraktionen wie die cAMP-Bindeaktivität. An die cAMP-Affinitätssäule bindet nur ein Bruchteil des 48kD Proteins (Abb. 19), die Waschschritte sind frei von diesem Protein und das Elutionsprofil entspricht dem der Regulatorischen Untereinheit (Abb. 8).

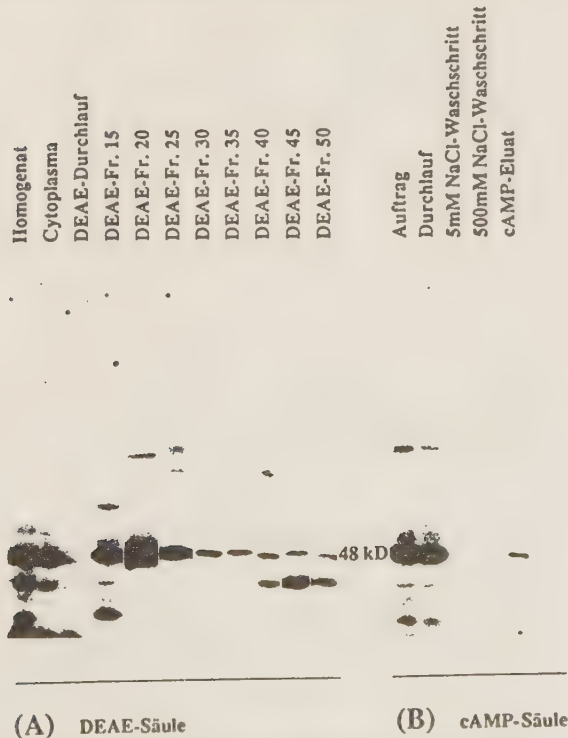


Abb. 19:
Säulenchromatographie des 48kD Proteins, auf Immunoblots detektiert mit mAb 112-296-2 und 125 J-SAM. (A) DEAE-Säule, pH 7.2, (B) cAMP-Affinitätssäule.

Obwohl die unvollständige Bindung an die cAMP-Säule gegen eine spezifische cAMP-Bindung sprach, wurde in DEAE-Säulenfraktionen nach Photoaffinitätsmarkierung eines 48kD Proteins gesucht. Wie Abb. 20 zeigt, konnte jedoch außer der Regulatorischen Untereinheit (40kD) und der unspezifischen Reaktion des 68kD Proteins (vergl. Abb. 11) keine Aktivität gefunden werden.

(A) Coomassiefärbung

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19



(B) Photoaffinitätsmarkierung

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19



Abb. 20:
Profil der DEAE-Säulenchromatographie pH 7.2, eluiert mit einem Salzgradienten von 5-250mM NaCl. (A) Coomassiefärbung, (B) Photoaffinitätsmarkierung.

5.1.5.3. Kreuzreaktionen der Antikörper 112-4-15 und 112-315-27

Es wurde der Frage nachgegangen, ob die Kreuzreaktionen des mAb 112-4-15 auf Homologien beruhen, die durch gemeinsame funktionelle Eigenschaften der Antigene zustande kommen. Dazu wurden wieder das Laufverhalten auf der DEAE- und der cAMP-Säule und die Photoasaffinitätsmarkierung herangezogen (Abb. 21).

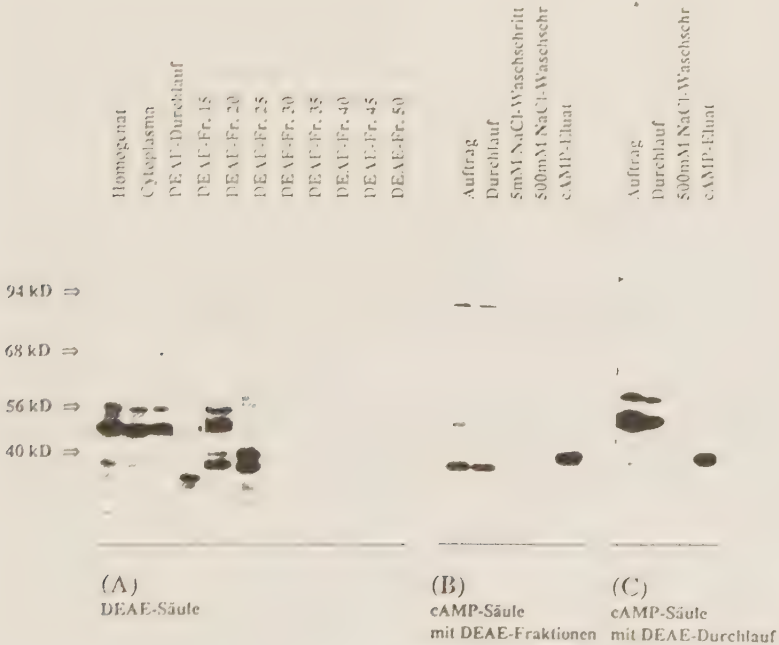


Abb. 21:

Chromatographie und indirekte Immunmarkierung der Proteine, die von dem kreuzreagierenden Antikörper 112-4-15 der Klasse 3 erkannt werden. (A) DEAE-Säulenprofil der Antigene mit Durchlauf und gebundenen Fraktionen (15-50), die mit 5-250mM NaCl eluiert wurden (B) cAMP-Affinitätssäule mit DEAE Bindefraktionen. (C) cAMP-Affinitätssäule mit DEAE-Durchlauf.=

112-4-15 Antigene im DEAE-Durchlauf:

Die in Gesamt-Zellhomogenaten dominierenden, mit dem mAb 112-4-15 reagierenden Antigene von 50/56kD finden sich im Durchlauf der DEAE Säule wieder. Trägt man den

Durchlauf der DEAE-Säule, der die 50/56kD-Antigene enthält, auf die cAMP-Affinitätssäule auf, so findet man die Proteine im Durchlauf wieder (Abb. 21C), sie zeigen also auf der Affinitätssäule keine cAMP-Bindung. Unter den an die Affinitätssäule gebundenen Proteinen aus dem DEAE-Durchlauf lassen sich in Coomassie und Silberfärbung nur drei Banden von 40, 48 und 60kD nachweisen (ohne Abbildung). Keine dieser Banden ist identisch mit der 50/56kD Doppelbande aus dem Zellhomogenat. Der mAb 112-4-15 reagiert nur mit einem der an die Affinitätssäule gebundenen Proteine. Dieses 40kD Protein ist identisch mit der Regulatorische Untereinheit, die sich aufgrund der schwachen Bindung an die DE-52 Säule als Kontamination in geringen Mengen im Durchlauf befindet und dann auf der Affinitätssäule angereichert wird. Dies konnte dadurch belegt werden, daß alle fünf mAb gegen die Regulatorische Untereinheit mit dem aus dem DEAE-Säulen-Durchlauf auf der Affinitätssäule angereicherten 40kD Protein stark reagieren.

112-4-15 Antigene in DEAE-Bindefraktionen:

In den Proteinfractionen, die an die DE52-Säule binden und mit dem Salzgradienten von 5-150mM NaCl eluiert werden, erkennt der mAb 112-4-15 neben der Regulatorischen Untereinheit eine Vielzahl verschiedener Banden von 25-100kD. Keines dieser anderen Protein bindet an die cAMP-Säule, alle erscheinen im Durchlauf (Abb. 21B). Die einzige Aktivität in den cAMP-gebundenen Fraktionen ist gegen R (40kD) gerichtet.

Da außerdem weder im Durchlauf (ohne Abbildung) noch in den eluierten Fraktionen der DEAE-Säule (Abb. 11, 20) zusätzliche Banden im Photoaffinitätslabel gefunden wurden, wurde die Schlußfolgerung gezogen, daß die Kreuzreaktionen der Antikörper nicht durch eine gemeinsame cAMP-Bindeaktivität ihrer Antigene zustande kommen.

5.2. DISKUSSION

Die Regulatorische Untereinheit von *Dictyostelium discoideum* ist ein Protein, das nur in geringen Mengen in den Zellen vorkommt: ca. 100000 Moleküle pro vegetative Zelle (Leichtling et al., 1984), und fünf- bis zehnmal soviel in späten Entwicklungsstadien. Dennoch ist die Aufreinigung einfach und schnell und man erhält nach zwei Säulenschritten stark angereichertes, wenn auch nicht absolut sauberes Material. Die Identität des aufgereinigten 40kD Proteins mit der Regulatorischen Untereinheit der cAMP regulierten Proteinkinase konnte über die Affinitäten für cAMP ($3 \times 10^{-8} \text{M}$) und cGMP ($5 \times 10^{-6} \text{M}$), und den pI (6.4) nachgewiesen werden.

In der Literatur sind wiederholt zwei Isoformen der Regulatorischen Untereinheit beschrieben worden (Leichtling et al., 1982; Majerfeldt, 1984); daher war das klare Auftreten von drei Spots in den 2D-Gelen unerwartet. Die Isoform am sauren Ende ist in allen beobachteten Fällen am schwächsten ausgeprägt und manchmal nur schwer zu detektieren. Da die Regulatorische Untereinheit ein Protein ist, das von einem einzigen Gen codiert wird (Veron, pers. Mitt.), muß es sich bei den Isoformen um Modifikationen einer einzigen Polypeptidkette handeln. In Frage kommen Phosphatgruppen, da *in-vitro*-Phosphorylierung der Regulatorischen Untereinheit mit heterologer Katalytischer Untereinheit nachgewiesen werden konnte (Majerfeldt et al., 1984). Das ^{32}P -markierte Protein von Majerfeldt et al. war auf der sauren Seite direkt neben den beiden in der Silberfärbung nachweisbaren Isoformen lokalisiert, also in der gleichen Position wie der nach Photoaffinitätsmarkierung erkennbare schwächste Spot in Abb. 13.

In der Regulatorischen Untereinheit aus *Dictyostelium* ist das in Säugern autophosphorylierte Serin-95 der R_{II} Untereinheit durch Alanin ersetzt wie in R_I , die typische Phosphorylierungsstelle fehlt also.

Die Fragen, ob Phosphorylierung wirklich die Ursache für die Aufspaltung der Isoformen ist, wenn ja, ob nur die saure Variante Träger einer Phosphatgruppe ist und die beiden anderen Formen durch andere Modifikationen verursacht werden, oder ob möglicherweise noch weitere Phosphorylierungsstellen vorliegen, können nur durch *in vivo* Phosphorylierungsexperimente beantwortet werden.

Phosphorylierungsereignisse an der Regulatorischen Untereinheit sind deswegen besonders interessant, weil sie an der weiteren Signaltransduktion beteiligt sein könnten, sei es durch die Freisetzung der Katalytischen Untereinheit, sei es, wie in Säugerzellen ebenfalls diskutiert, durch eine Aktivität analog zum CAP in Bakterien (Aiba, 1983; Raibaud & Schwarz, 1984).

Neben der Regulatorischen Untereinheit als Hauptprotein der cAMP-Säuleneluat reicht das Bandenspektrum von 30kD über 34, 36, 38, 48, 56 und 94kD. Die Charakterisierung dieser Kontaminationen ergab in keinem Fall Hinweise auf weitere cAMP-Bindeproteine: Die niedermolekularen Banden von 34-38kD stellen mit hoher Wahrscheinlichkeit proteolytische Abbauprodukte der Regulatorischen Untereinheit dar, da alle diese Banden von den fünf R-Antikörpern erkannt werden. Diese Fragmente entstehen erst während der Aufreinigung größerer Mengen Zellen, da sie in Immunoblots mit Gesamt-

Zellhomogenaten nicht nachweisbar sind und auch in der Photoaffinitätsmarkierung, für die die Präparationen in kleinen Volumina schneller durchgeführt werden konnten, nicht auftauchten. Die proteolytische Empfindlichkeit der Regulatorischen Untereinheit ist in der Literatur gut dokumentiert (Leichtling et al., 1982; Leichtling et al., 1984)

Bei der in späteren Präparationen nur noch sehr schwachen Bande von 30kD handelt es sich um das Lektin Discoidin I, das aufgrund seiner Galaktose-Bindeaktivität mit der Matrix der Affinitätssäule interagiert und als Artefakt in den cAMP-Bindefraktionen auftaucht.

Die Bindung der 56, 68 und 94kD Proteine an die Affinitätssäule scheint seine Ursache in einer niederaffinen und unspezifischen Interaktion mit cAMP zu haben, da diese Proteine auch in der Photoaffinitätsmarkierung mit 8-N₃-cAMP hervortreten, diese Markierung aber nicht mit zugesetztem kaltem cAMP kompetierbar ist. Die Markierung des 56kD Proteins wurde jedoch durch ATP unterbunden, was die Unspezifität der Reaktion mit cAMP unterstreicht.

Die Ursachen für das Auftauchen des 48kD Proteins in den Fraktionen der cAMP-Affinitätssäule sind unklar. Obwohl die Abwesenheit des 48kD Proteins in den Waschschritten der Säule und die Elution in Form eines kompakten Peaks gemeinsam mit der Regulatorischen Untereinheit eine spezifische Interaktion vermuten ließen, kann diese Annahme nicht aufrechterhalten werden: die ineffiziente Bindung an die cAMP-Säule und das Fehlen einer Photoaffinitäts-Markierung sprechen gegen eine nennenswerte Affinität für cAMP. Es wurde daher angenommen, daß die Bindung des 48kD Proteins an die cAMP-Affinitätssäule unspezifisch erfolgt, obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, daß die Testbedingungen der Interaktion mit cAMP für das 48kD Protein suboptimal sind. Es wurde z.B. gefunden, daß die Bindung an die cAMP-Säule bei pH 5 noch stabil ist und nach Elution eine fast kontaminationsfreie 48kD-Präparation ergibt. Eventuell könnten unter solchen veränderten Test-Bedingungen spezifische cAMP-Bindeaktivitäten nachgewiesen werden. Auch kann nicht ausgeschlossen werden, daß das 48kD Protein wegen Wechselwirkungen mit an der Säule haftenden Proteinen zurückgehalten wird.

Auch über die Kreuzreaktionen der Antikörper 112-4-15 und 112-315-36 konnten keine weiteren cAMP-bindenden Proteine identifiziert werden. Keines der Proteine, die diese Antikörper im Durchlauf der DEAE-Säule oder in den Salzfraktionen erkennen - außer der Regulatorischen Untereinheit - bindet an die Affinitätssäule oder wird durch Photoaffinitätsmarkierung erfaßt.

Erstaunlicherweise konnte das zweite für *Dictyostelium* beschriebene cAMP-Bindeprotein CABP-1 (Tsang & Tasaka, 1986) nicht gefunden werden. Es ist ein Heterodimer von 40 und 36kD, das bei pH 7.2 nicht an die DEAE-Säule bindet und über eine Affinitätssäule gereinigt werden kann. Dieses Protein bindet sehr stark an die cAMP-Säule und eluiert nur unvollständig nach Äquilibration mit 1mM cAMP, auch konnte es bis jetzt nicht durch Photoaffinitätsmarkierung nachgewiesen werden. Obwohl die Regulatorische Untereinheit und die 40kD Untereinheit von CABP-1 gleiches Molekulargewicht aufweisen, sind sie auf der Basis von pI und Antikörper-Kreuzreaktivitäten verschieden.

Aus dem Durchlauf der DEAE-Säule wurden cAMP-Bindefraktionen auf der Affinitätssäule gewonnen. Die erwartete 36kD Bande konnte jedoch weder durch Coomassie- noch durch Silberfärbung detektiert werden, und die gefundene 40kD Bande war mit der Regulatorischen Untereinheit identisch, da alle R-spezifischen Antikörper mit dieser Bande reagierten. Diese Markierung kann nicht auf Kreuzreaktionen zurückgeführt werden, da die in diesen Experimenten verwendeten monoklonalen Antikörper monospezifisch für die Regulatorische Untereinheit sind, wie 2D-Blots mit Gesamt-Zellhomogenaten zeigen.

Erklärungen für das Fehlen von CABP-1 könnten in der Verwendung anderer Zellen als Ausgangsmaterial liegen: Tsang und seine Mitarbeiter verwendeten Kulturen, die sich auf Agar morphologisch zu Slugs entwickelt hatten, während für meine Präparationen in Suspension entwickelte Zellen verwendet wurden. Einerseits könnte ein Ausbleiben des Entwicklungsanstieges des CABP-1 in Suspension dazu führen, daß es in den Präparationen nicht nachweisbar ist, andererseits könnte trotz Entwicklungsanstieg eine effiziente Translokation in den Kern dafür verantwortlich sein, daß das Protein aus den Cytoplasmafraktionen verschwindet und unter der Nachweisgrenze bleibt.

Die Präparationen der Regulatorischen Untereinheit wurden zum Immunisieren von Mäusen und zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern verwendet. Da diese Präparationen nicht völlig sauber waren, wurden neben den mAb gegen die Regulatorische Untereinheit auch Antikörper mit anderen Spezifitäten gefunden, wie z.B. diejenigen gegen das 48 kD Protein.

Interessant erschien die Spezifität der mAb 112-4-15 und 112-315-27, die in gereinigten Fraktionen die regulatorische Untereinheit erkennen, in Zellhomogenaten aber hauptsächlich eine 50/56kD Doppelbande markieren. Diese beiden Proteine befanden sich nicht in der zur Immunisierung verwendeten Präparation, da sie während der DE-Säulenchromatographie abgetrennt wurden; es handelt sich also um Kreuzreaktionen durch strukturelle Gemeinsamkeiten, die jedoch nicht mit einer cAMP-Bindeaktivität in Zusammenhang stehen.

Die Regulatorische Untereinheit ist also in den verwendeten Suspensionskulturzellen das einzige nachgewiesene cAMP-Bindeprotein und neben dem CABP-1 der einzige Kandidat für die Transduktion intrazellulärer cAMP-Signale. Die fünf isolierten monospezifischen Antikörper gegen die Regulatorische Untereinheit wurden benutzt, um Mutanten zu suchen, die Defekte in der Regulatorischen Untereinheit aufweisen. Über die Effekte in solchen Mutanten wollten wir solche Funktionen identifizieren.

6. MUTANTEN-SELEKTION UND -ANALYSE

6.1. ERGEBNISSE

6.1.1. Mutante HG778

Nach chemischer Mutagenese mit MNNG (Überlebensrate 20%) wurden Zellsuspensionen in einer Dichte auf SM-Agar ausplattiert, daß Einzelzellen als Klone anwuchsen. Als die Kolonien gut sichtbar waren (1-3mm), so daß auch langsam wachsende Klone erfaßt werden konnten, wurden insgesamt 5000 Klone in regelmäßigem 56-Raster parallel auf je 2 frische SM-Platten überimpft. Nach weiteren 2-3 Tagen Wachstum wurde eine der beiden Parallelplatten im Kolonieblot-Verfahren auf Nitrocellulose transferiert, die Regulatorische Untereinheit mit ^{125}J -mAb 106-283-1 detektiert und die Autoradiogramme nach nicht- oder schwach-markierten Kolonien durchgesucht.

Unter 5000 Kolonien wurde eine Mutante mit schwacher Markierung im Kolonieblot identifiziert, die weiter charakterisiert wurde. Diese Mutante wächst langsamer als der Wildtyp (Generationszeit ca. 16h), aggregiert ohne Ströme in winzige "mounds" aus denen nur selten kleine Fruchtkörper entstehen (Abb. 22).

Immunoblot-Analysen bestätigten sowohl in vegetativen als auch in entwickelten Zellen die Reduktion in der Menge an Regulatorischer Untereinheit (Abb. 23); entwicklungsregulierte Kontrollproteine - contact site A (csA) und A2C5 - hingegen wurden in normalen Mengen gefunden (vergl. Abb. 26).

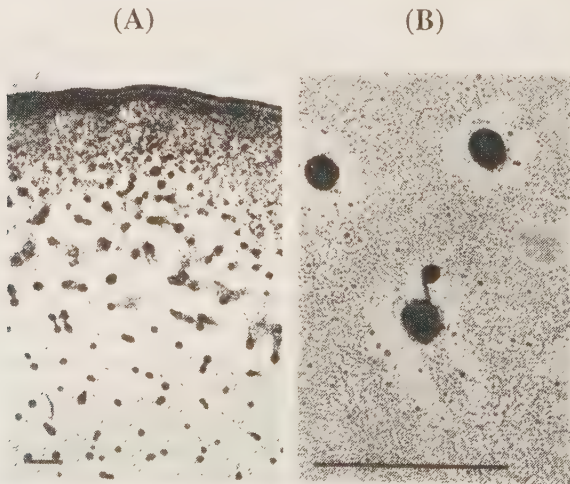


Abb. 22: Morphologie der Mutante HG778 auf Normalagar.

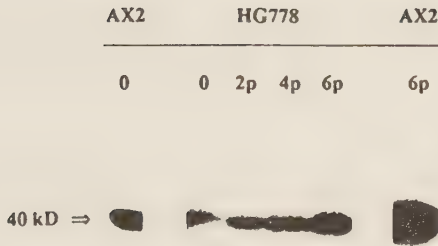


Abb. 23:

Detektion der Regulatorischen Untereinheit in der Mutante HG778 auf Immunoblots mit ^{125}J -mAb 80-386-10. Die Zellen wurden während der Suspensionsentwicklung (0-6 = Zeit in Stunden) alle 8min mit $5 \times 10^{-8}\text{M}$ cAMP gepulst (p)

6.1.2. Messungen des cAMP-Relays und der cGMP-Antwort

Um darüberhinausgehend abzusichern, daß die Defekte der Mutante nicht auf einen allgemeinen Entwicklungsblock zurückzuführen sind, wurden der cAMP-Relay und die intrazelluläre cGMP-Antwort auf externe cAMP-Stimuli in suspensionsentwickelten Zellen gemessen. Als Kontrollen dienten der Wildtyp AX2 und die im cAMP-Relay defekte Mutante Agip53 (Wurster & Bumann, 1981).

Die Mutanten-Zellen wurden bei einer Dichte von 1×10^7 Zellen/ml für 6h in Suspension geschüttelt und zur Stimulation der Entwicklung mit cAMP gepulst. AX2 Zellen läßt man nur 3-4h entwickeln, um zu vermeiden, daß die Zellen endogene Oszillationen ausführen, deren Adaptationsphasen dann zu verminderten Antworten auf die exogenen Pulse führen können. Anschließend wurden die Zellen auf 6.25×10^7 Zellen/ml konzentriert, mit $1/5$ Volumen $5 \times 10^{-5}\text{M}$ cAMP stimuliert für die cGMP-Messungen, bzw. mit $5 \times 10^{-5}\text{M}$ 2'd-cAMP für die cAMP-Relay-Bestimmungen, so daß sich Endkonzentrationen von 5×10^7 Zellen/ml und $1 \times 10^{-5}\text{M}$ Stimulans einstellten. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und in Perchlorsäure lysiert. Die Nukleotid-Konzentrationen in den Lysaten wurden mit kommerziellen Ria-kits bestimmt (Abb. 24).

Die Mutante Agip53 zeigte das erwartete Verhalten: normalen cGMP-Anstieg, jedoch keinen meßbaren Anstieg der cAMP-Konzentration (Wurster & Bumann, 1981). Auch die Mutante HG778 zeigte ein im Vergleich zum Wildtyp geändertes Verhalten; während der cAMP-Relay im Rahmen der Meßgenauigkeit dem des Wildtyps entsprach, war die cGMP-Antwort stark reduziert. Diese Reduktion der cGMP-Antwort war auch bei einer Chemotaxis-gekoppelten Reaktion sichtbar, die wahrscheinlich über cGMP vermittelt wird: die durch einen cAMP-Stimulus hervorgerufenen Änderungen der Lichtstreuung in einer dichten Zellsuspension

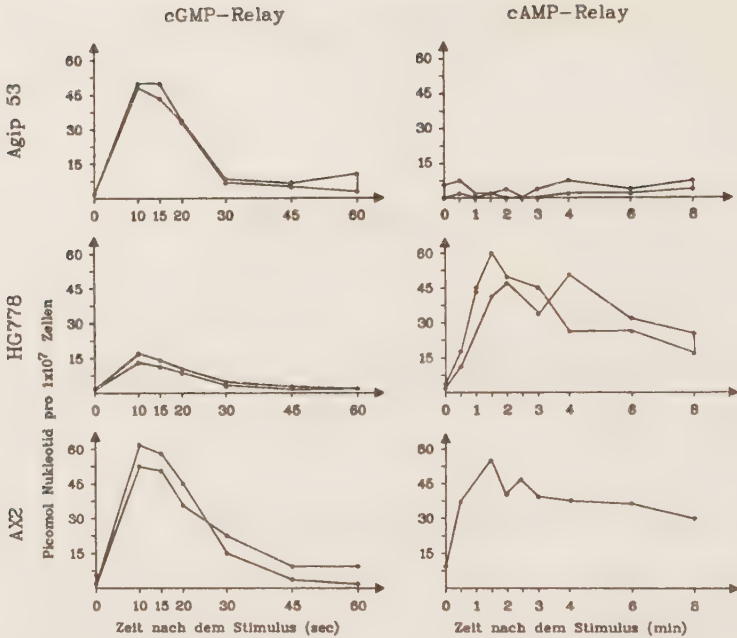


Abb. 24:
cAMP-Relay und cGMP-Produktion in den Stämmen AX2, HG778 und Agip53.

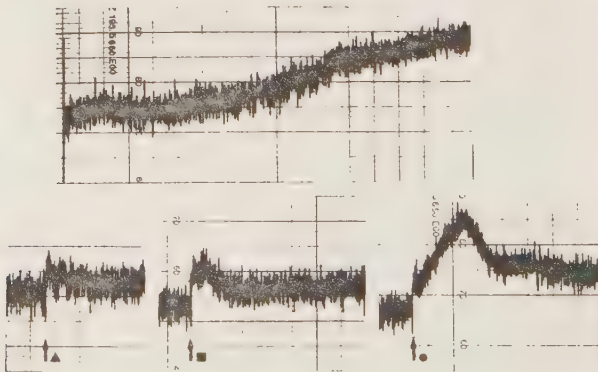


Abb. 25:
Autonome Lichtstreuungsozillationen fehlen in der Mutante HG778. Antworten auf externe cAMP-Pulse: $s = 1 \times 10^{-7}M$, $n = 1 \times 10^{-6}M$, $i = 1 \times 10^{-5}M$, die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Stimulation.

Während bei der Mutante HG778 erst bei hohen cAMP-Konzentrationen (1×10^{-5} bis 1×10^{-6} M) Änderungen erkennbar waren (Abb. 25), reagierten Wildtyp-Zellen schon auf 1×10^{-9} bis 1×10^{-8} M cAMP-Signale.

6.1.3. Genexpressionsanalysen

Die Mutante HG778 weist vielfältige Anomalitäten auf: Während auf Bakterien gewachsene Zellen einen normalen Verlauf der Expression entwicklungsregulierter Proteine zeigten, wurden bei axenischer Kultur schon während des Wachstums strikt entwicklungsregulierte Proteine wie contact sites A (csA) gefunden (Abb. 26).

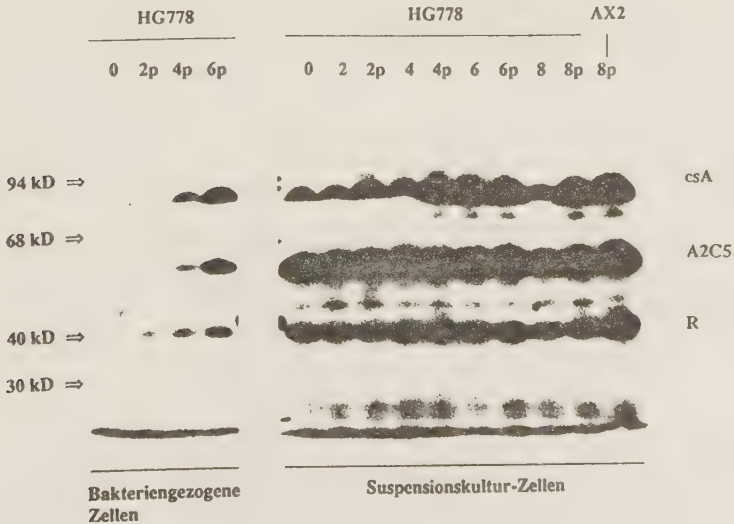


Abb. 26:

Vergleich des Entwicklungsverlaufes von Kulturen der Mutante HG778, die auf Bakterien-Platten oder axenisch in Suspensionskultur gezogenen wurden. Gestestet wurde die Expression der Regulatorischen Untereinheit (R), des Proteins des cDNA-Klons A2C5 und der csA; 0-8 = Zeit Entwicklung in Suspensionsbedingungen, p = gepulst mit 5×10^{-8} M cAMP. Bis auf die schwächere Expression der Regulatorischen Untereinheit entspricht t₀ bei AX2 dem bei HG778 (vergl. Abb. 23).

Um diesen Regulationsdefekt zu charakterisieren, wurden in verschiedenen Stämmen (AX2, HG302, HG592, Agip53, HG778) die Expressionsmuster entwicklungsregulierter RNA und, soweit Antikörper vorhanden, auch der codierten Proteine verglichen.

Dies sollte eine Zuordnung der Regulatorischen Untereinheit zu einer Gruppe co-regulierter Gene ermöglichen und Abweichungen der Expressionssteuerung der Regulatorischen Untereinheit in der Mutante HG778 von der in anderen Stämmen aufdecken. Auf diese Weise wollten wir erstens Hinweise auf die Ursachen der Reduktion der Regulatorischen Untereinheit und zweitens Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Reduktion der Regulatorischen Untereinheit und den anderen Anomalitäten der Mutante HG778 erhalten.

Die Mutante Agip53 ist eine nichtaggregierende Mutante des AX2, bei der die Signaltransduktion vom cAMP-Rezeptor zur Adenylatcyclase defekt ist: Die Adenylatcyclase zeigt normale Basalaktivität, kann jedoch durch cAMP-Stimuli nicht aktiviert werden. Daher sind die Zellen nicht zum Relay befähigt und weisen einen niedrigen intrazellulären cAMP-Spiegel auf. Durch exogene Stimulation mit cAMP-Pulsen in Suspension kann man die Expression von Entwicklungsmarkern induzieren, ohne daß die Zellen zur normalen Morphogenese befähigt werden.

Die Mutante HG592 wurde aus dem cAMPS resistenten AX2-Derivat HG302 gewonnen (Rossier et al., 1987; Gerisch et al., 1985). Bei ihr sind mehrere im Wildtyp obligatorische Entwicklungsinduktionsschritte umgangen: Sie exprimiert bereits im Wachstumsmedium beim Einlaufen in die stationäre Phase entwicklungsregulierte Proteine wie csA und die Adenylatcyclase. Auch entwicklungsregulierte mRNAs konnten nachgewiesen werden.

Beide Vergleichsmutanten weisen also entgegengesetzte Regulationsdefekte auf: Während die Mutante HG592 im Wildtyp vorhandene Induktionsprozesse nicht mehr als Startsignale für die Entwicklung benötigt, ist die Mutante Agip53 weitgehend abhängig von der Zuführung externer Stimuli, da sie selbst nicht in der Lage ist, diese Signale zu produzieren.

Die Stämme wurden axenisch angezogen und bei wachsenden Zelldichten Proteinproben und RNA präpariert. Parallel wurden exponentiell wachsende Zellen (AX2 und HG302: 5×10^6 , Agip53: 1×10^6 , HG592 und HG778: 5×10^5 Zellen/ml) geerntet, zur Entwicklung in Suspension angesetzt und zu den angegebenen Zeitpunkten des Entwicklungsverlaufs Proben genommen. Gele wurden mit 1×10^6 Zelläquivalenten Protein bzw. $10 \mu\text{g}$ RNA/Spur geladen. Die Immunoblots wurden mit verschiedenen Antikörpern getestet, Northern Blots wurden mit den unter 4.5.1. beschriebenen cDNA-Proben hybridisiert.

6.1.3.1. Herstellung der Hybridisierungsproben

Für die Genexpressionsanalysen wurden cDNA-Klone verwendet, deren korrespondierende RNAs in der Frühentwicklung reguliert sind. P52H11 und die kleinsten Banden der Ubiquitin-RNA (UbiI/1 und 2) nehmen während der Entwicklung ab. Alle anderen RNAs werden während der Entwicklung vermehrt exprimiert. A11B6, A2C5, P23E4, P26E8 und die kleineren Banden des Ubiquitins (UbiI/3-6 sind in

vegetativen Zellen nachweisbar, aber schwächer exprimiert als während der Entwicklung. Die RNA des Klons A11H2 ist in vegetativen Zellen nachweisbar, wenn auch nur nach langen Expositionszeiten der Autoradiogramme ist (in Abb. 28 nicht erkennbar). Dies wurde auch durch Ergebnisse von Thomas May (pers. Mitt.) bestätigt. M7E5, P29F8, csA und die Phosphodiesterase (PD) sind strikt reguliert, d.h. sie sind in vegetativen Zellen nicht nachweisbar und werden während der Entwicklung induziert. Eine detailliertere Beschreibung der Herkunft und Eigenschaften der Klone und ihrer RNAs befindet sich im Material-und-Methoden Teil unter 4.5.1., Seite 33.

Für den PD-Klon stand ein Riboprobe-Template zur Verfügung, alle anderen Klone wurden durch Nicktranslationen für die Hybridisierung markiert: 1µg der Plasmide wurden in den Stamm *E. coli* MC1061 transformiert und Plasmid-tragende Klone auf LB-Platten mit 100µg/ml Ampicillin selektioniert. Aus 500ml von Übernachtskulturen wurden die Plasmide gereinigt, jeweils $1/10$ - $1/5$ der erhaltenen Plasmid-DNA mit *Eco*RI verdaut und die Inserts isoliert (Abb. 27). Diese Inserts wurden für Nicktranslationen eingesetzt.

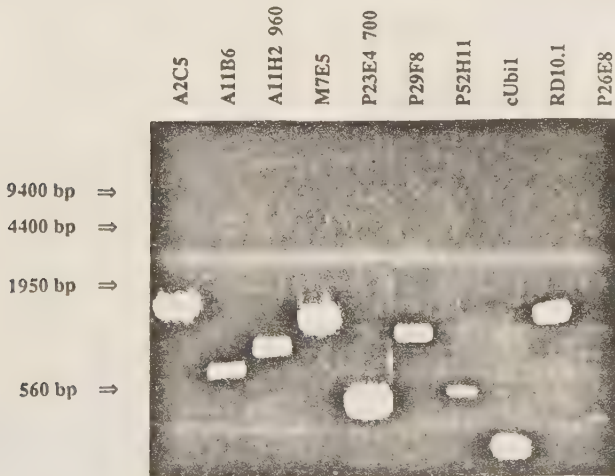


Abb. 27: Insertpräparationen der für Nicktranslationen eingesetzten cDNA-Klone

Die Hybridisierung der Northern Blots mit nicktranslatierten *Eco*RI-Inserts aus dem Plasmid RD10.1 ergab unerwartete Bandenmuster. Dieses Insert ist 1350bp groß, 1200bp codieren für einen vollständigen cDNA-Klon der Regulatorischen Untereinheit, der das Startcodon ATG und den polyA-Tail umfaßt. Zusätzlich enthält der Klon eine sehr A/T-reiche 5'-Extension von ca. 150bp. Da mit den *Eco*RI-Inserts mehrere Banden

aufleuchteten, die alle die gleiche Regulation aufweisen, zweitens diese Banden mit ca. 1700-1900bp unerwartet groß waren und an derselben Position wie die kleine ribosomale RNA lagen, bestand die Möglichkeit, daß es sich bei diesen Banden um unspezifische Reaktionen der 5'-Extension handelte. Deshalb wurden die 100 und 800bp *MaeIII* Fragmente, die nur aus dem codierenden Teil des RD-Klons stammen, auf Gesamt-RNA und polyA-RNA getestet. In beiden RNA-Proben leuchtete mit diesen Fragmenten nur die 1800bp Bande auf. Diese Bande entspricht der Hauptbande der mit dem *EcoRI* Fragment hybridisierten Blots und stellt also die mRNA der Regulatorischen Untereinheit der cAdPK dar. Die größere Bande könnte eine nicht prozessierte Vorläufer-RNA sein.

Zu beachten ist auch, daß die detektierten RNA Mengen nahe der Nachweisgrenze waren. Die mRNA ist in vegetativen Zellen kaum sichtbar, obwohl auf Proteinebene das Molekül deutlich nachweisbar ist. Für die RNA ist ein 10-20-facher Anstieg während der Entwicklung beschrieben (de Gunzburg et al., 1986), wohingegen das Protein sich um einen Faktor 5 (Leichtling et al., 1984; Woffendin et al., 1986; Schaller et al., 1984) bis 10 (Vaughan & Rutherford, 1987; eigene Experimente) vermehrt anhäuft.

6.1.3.2. AX2

Es zeigte sich, daß die Einteilung der Klone in "vermehrt exprimierte" und "strikt regulierte" Gruppen (Gerisch et al., 1985) modifiziert werden muß. Mit den "strikt regulierten" Klonen A11H2 und P23E4 sind auch bei tg-Zellen geringe RNA-Mengen nachweisbar, sie sind also "vermehrt exprimiert" (Abb. 28). Die Stimulation durch cAMP-Pulse in Suspension konnte nur für die RNAs der Klone PD, M7E5 und Ubi 2/3 reproduziert werden, nicht jedoch für A2C5, P29F8 und A11H2. Insgesamt sind die Pulseffekte sehr schwach, was darauf zurückzuführen ist, daß AX2 nach 3-4h in Suspension autonom oszilliert, d.h. selbst Pulse erzeugt. Deshalb beruht der Haupteffekt exogener Pulse auf einer Verkürzung der Zeit, in der die Zellen keine Pulssignale erhalten und einer kurzfristigen Beschleunigung der Entwicklung. Während der Wachstumsphase konnten wie erwartet bei keinem der getesteten Klone signifikante Anstiege der Genexpression festgestellt werden.

Nach den im Wildtyp beobachteten Regulationsmustern der RNAs kann man die Klone in 3 Gruppen einteilen:

1. Abnahme während der Entwicklung (P52H11, Ubi5)
2. "vermehrt exprimiert", d.h. Nachweisbarkeit in vegetativen Zellen, Zunahme während der Entwicklung (P26E8, A11B6, A2C5, A11H2, P23E4, RD, Ubi1-4)
3. "strikt reguliert", d.h. Expression ausschließlich in sich entwickelnden Zellen (csA, M7E5, P29F8, PD). M7E5 unterscheidet sich von den anderen Klonen durch den Stop der Expression in tg-Zellen.

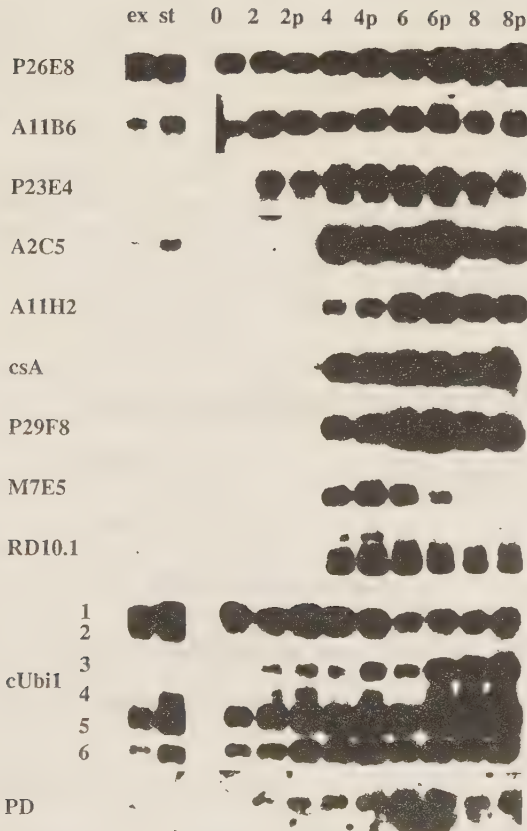


Abb. 28:

Northern-Blots mit RNA vegetativer (Spur 1-3) und sich entwickelnder (Spur 4-11) AX2-Zellen, hybridisiert mit verschiedenen cDNA-Proben, die entwicklungsregulierte mRNA-Spezies erkennen. exp = exponentiell wachsende Zellen, stat = Zellen aus stationärer Kultur, 0 = vegetative Zellen einer Dichte von 5×10^6 Zellen/ml, 2-8 = Zeit der Entwicklung in Stunden, p = mit 5×10^{-8} M cAMP gepulste Zellen.

6.1.3.4. HG592

Das Hauptaugenmerk wurde bei der Mutante HG592 auf die Genregulation während des Wachstums gelegt (Abb 29). Mit Ausnahme von vier RNA-Spezies (s.u.) weisen alle getesteten Transkripte den gleichen Verlauf der Genexpression auf: Sie sind in allen untersuchten Phasen vegetativen Wachstums schwach nachweisbar, beginnend in

exponentiellen Kulturen bei 3×10^5 Zellen/ml; diese schwache Expression wird beibehalten bis die Kultur in die stationäre Phase kommt. Dann erfolgt eine weitere vorübergehende Stimulation, woraufhin das vorherige Niveau wieder erreicht wird.

Ausnahmen von diesem generellen Bild stellen die RNAs der Klone A11B6, P29F8, M7E5 und P26E8 dar. (1) P26E8 ist bei allen Zelldichten im Wachstumsmedium stark exprimiert und weist kein Maximum wie die anderen Klone auf. (2) P29F8 kann in keiner Phase der Kultur in Wachstumsmedium detektiert werden. (3) M7E5 ist während des Wachstums nicht nachweisbar, wird aber beim Erreichen der stationären Phase schwach sichtbar. (4) Die maximale Expression der A11B6-spezifischen RNA findet man im Gegensatz zu allen anderen RNAs erst am Ende der stationären Phase.

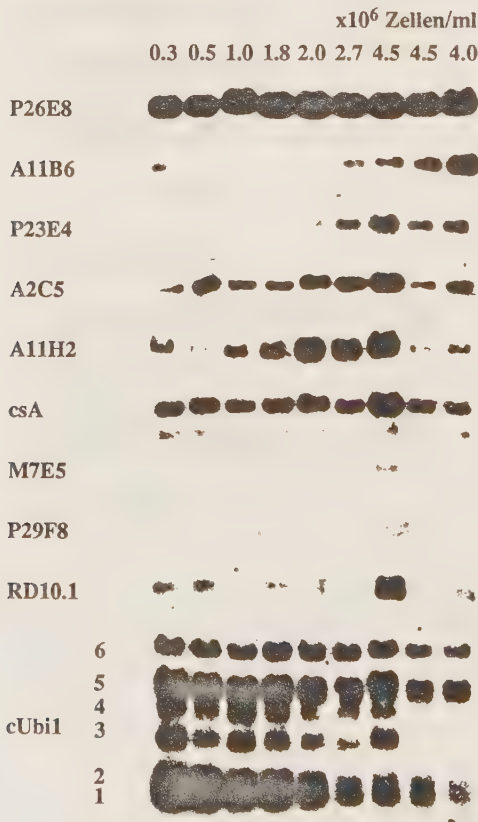


Abb. 29:

Northern-Blots mit RNA vegetativer Zellen des Stammes HG592 aus unterschiedlichen Wachstumsphasen, hybridisiert mit verschiedenen cDNA-Proben.

Alle RNA-Spezies, die auch während der Entwicklung getestet wurden (P23E4, M7E5, P26E8 und P29F8), werden noch über das maximale Niveau der Wachstumsphase hinaus vermehrt exprimiert und zeigen deutliche cAMP-Pulseffekte (Abb. 30).

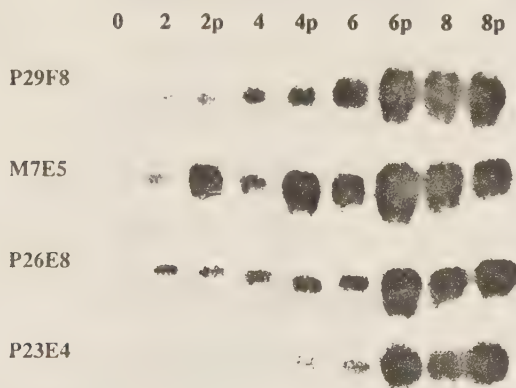


Abb. 30:

Northern-Blots der RNA vegetativer und sich entwickelnder HG592 Zellen, hybridisiert mit verschiedenen cDNA-Proben. exp = exponentiell wachsende Zellen, 0 = vegetative Zellen einer Dicht von 5×10^5 Zellen/ml, 2-8 = Zeit der Entwicklung in Stunden, p = mit 5×10^{-8} M cAMP gepulste Zellen.

6.1.3.5. HG778

Die Zellen für den Entwicklungsverlauf (Abb. 31) wurden bei einer Dichte von 7×10^5 Zellen/ml geerntet. Zu diesem Zeitpunkt waren mit Ausnahme der M7E5-spezifischen RNA, die generell in diesem Stamm nur schwach exprimiert wurde, alle RNAs - auch die der strikt regulierten Gruppe - klar erkennbar.

Die RNAs der meisten Klone zeigten starke Pulseffekte und erreichten das Wildtypniveau der Expression nur in den gepulsten Kulturen. Die Transkripte des Klons A2C5 blieben ohne Pulse auf dem niedrigen Niveau der vegetativen Zellen, sie wurden nur bei Pulsstimulation vermehrt exprimiert. Bei A11H2, M7E5, P29F8, csA und RD war ein Anstieg der RNA ohne Pulse nur zu den späten Zeitpunkten der Suspensionsentwicklung erkennbar, erreichte jedoch nicht das Wildtypniveau der gepulsten Proben.

Ausnahmen von diesen starken Pulseffekten stellten die RNAs der Klone P26E8, P23E4 und RD dar. Während P26E8 auch durch Pulse kaum stimuliert werden konnte, ist die Induktion bei P23E3 und PD unabhängig von den exogenen Pulsen.

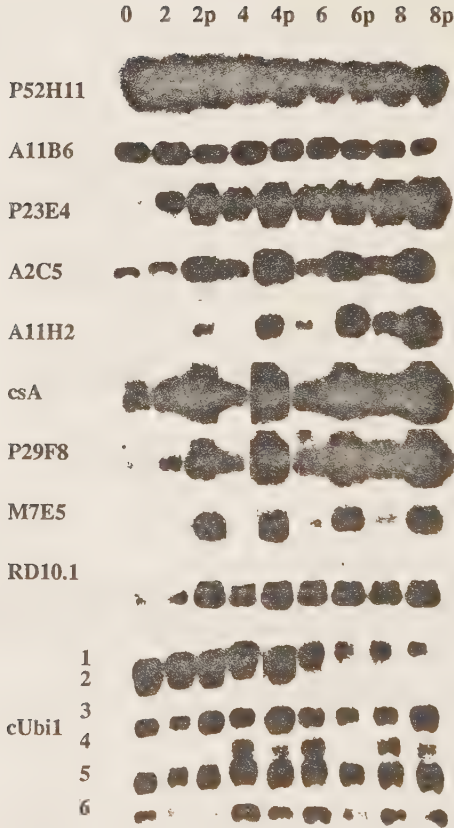


Abb. 31:

Northern-Blots der RNA vegetativer und sich entwickelnder HG778 Zellen, hybridisiert mit verschiedenen cDNA-Proben. 0 = vegetative Zellen einer Dichte von 7×10^5 Zellen/ml, 2-8 = Zeit der Entwicklung in Stunden, p = gepulst mit 5×10^{-8} M cAMP.

Nach dem Befund, daß die Mutante HG778 wie HG592 schon während des Wachstums entwicklungsregulierte Gene und Proteine exprimiert, wurden RNA-Proben bei verschiedenen Zelldichten in Wachstumsmedium genommen. In Schüttelkulturzellen die bei niedrigen Zelldichten geerntet worden waren, konnte mit den Testklonen keine RNA

nachgewiesen werden, die Mutante HG778 hat also im Gegensatz zu HG592 einen echten "vegetativen" Zustand (Abb. 32). Setzt man solche Zellen zur Entwicklung an, zeigt sich nur zu frühen Zeitpunkten eine starke Stimulation durch cAMP-Pulse; die RNAs erreichen zu späteren Zeitpunkten auch ohne Pulse die maximale Expression (Abb. 33).

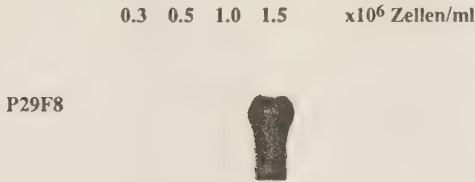


Abb. 32:
Northern-Blots vegetativer Zellen der Mutante HG778 aus verschiedenen Wachstumsphasen, hybridisiert mit der P29F8-Probe.

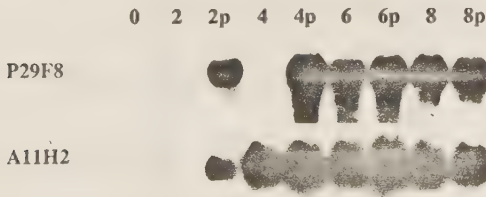


Abb. 33:
Northern-Blots der RNA aus HG778-Zellen verschiedener Entwicklungsstadien, hybridisiert mit entwicklungsregulierten cDNA-Klonen. 0 = vegetative Zellen einer Dichte von 3×10^5 Zellen/ml, 2-8 = Zeit der Entwicklung in Stunden, p = mit 5×10^{-8} M cAMP gepulste Zellen.

Die mRNA der Regulatorischen Untereinheit hat in der Mutante HG778 Wildtypgröße. Sie ist während der Entwicklung in Suspensionskultur induzierbar und wird in Mengen gebildet, die denen des AX2 vergleichbar sind. Die Steuerung ihres Anstieges unterscheidet sich nicht von der der vermehrt exprimierten (A11B6, P26E8, A2C5, A11H2) und induzierten (M7E7, P29F8, csA) RNA-Gruppen.

6.1.3.6. Agip53

In der Mutante Agip53 waren in vegetativen Zellen die Transkripte der gleichen Klone exprimiert wie im Wildtyp: A11B6, P23E, A2C5, P26E8 (Abb. 34) und schwach A11H2 (ohne Abbildung). Die erwartete strikte Abhängigkeit der Expression entwicklungsregulierter Gene von exogenen cAMP-Pulsen (Juliani & Klein, 1978) wurde nur für die Klone M7E5 und P29F8 gefunden. Alle anderen untersuchten RNAs wurden nach Beginn der Entwicklung auch ohne Pulsstimulation vermehrt exprimiert. Die Pulse führten bei P23E4 nur zu einem anhaltend hohen Expressionsniveau (= "Stabilisation") und bei P26E8 zu einem verfrühten Anstieg und bei A2C4, A11H2 und csA gleichzeitig zu einer Stabilisation und vermehrten Akkumulation. Die A11B6-spezifische RNA zeigte als einzige keine Pulsstimulation und erreicht auch während der Entwicklung nicht das Expressionsniveau der Wildtyps AX2.

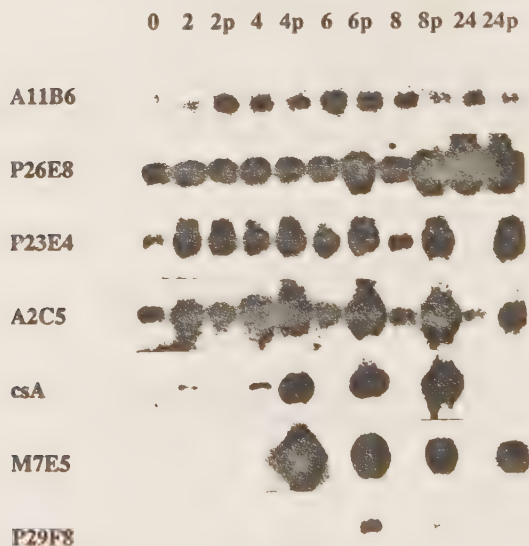


Abb. 34:

Northern-Blots der RNA vegetativer und sich entwickelnder Agip53 Zellen, hybridisiert mit verschiedenen cDNA-Proben. 0 = vegetative Zellen einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml, 2-8 = Zeit der Entwicklung in Stunden, p = gepulst mit $5 \times 10^{-8} \text{M}$ cAMP.

In der Mutante Agip53, die nicht in der Lage ist intrazelluläre cAMP-Oszillationen auszuführen, konnte die Expression der csA nicht nur durch exogene cAMP-Pulse sondern auch durch Folsäure-Pulse stimuliert werden. (Abb. 35). Die Regulatorische

Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase, die in der Mutante Agip53 durch cAMP-Pulse stimuliert werden kann, reagiert nicht merklich auf diese Folsäurepulse.

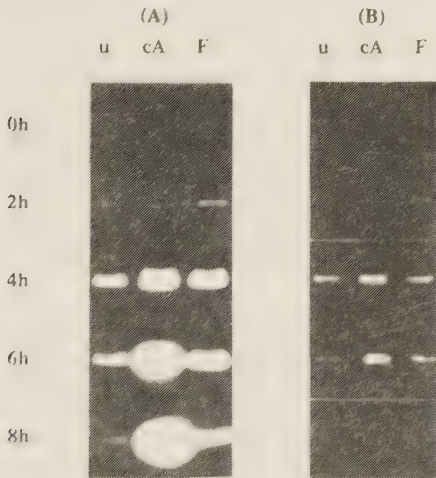


Abb 35:
Expression der cA und der Regulatorischen Untereinheit in cAMP- (cA) und Folsäure-gepulsten (F) Zellen, (u) ungepulste Kontrollzellen.

6.1.3.7. Zusammenfassung der Genexpressionsanalysen

Durch Vergleich der Expressionsmuster verschiedener RNAs in den drei verschiedene Stämmen AX2, HG592 und Agip53 konnten die Transkripte klassifiziert werden (Tab. 2). Bemerkenswerte Eigenschaften weist die von dem Klon A11B6 detektierte RNA auf, die in den Mutanten Agip53 und HG778 durch Pulse nicht stimuliert werden kann, obwohl die Expression der anderen RNAs in diesen beiden Stämmen durch cAMP-Pulse verstärkt werden kann.

Die Regulatorische Untereinheit ist Mitglied der Gruppe A2C5, A11H2 und P23E4. Auch in der Mutante HG778 unterscheidet sich die Expression der Regulatorischen Untereinheit nicht von der der anderen RNAs dieser Gruppe.

Die Genexpression des Stammes HG778 weist Gemeinsamkeiten mit beiden Vergleichsmutanten auf. Mit der Mutante HG592 teilt HG778 die Eigenschaft, bereits während des Wachstums entwicklungsregulierte Gene zu exprimieren, also im Wildtyp erforderliche Induktionsprozesse nicht zu benötigen. Am deutlichsten wird

dies durch die Anwesenheit der Genprodukte P29F8 und *csA*, die in AX2 strikt reguliert sind. HG778 unterscheidet sich jedoch von HG592, bei der alle untersuchten Transkripte (bis auf P29F8) in allen Wachstumsphasen nachweisbar, also konstitutiv exprimiert sind, dadurch, daß diese Gene erst in späten Wachstumsphasen induziert werden. Vorher weist HG778 einen echten vegetativen Zustand ohne Expression entwicklungsregulierter Gene auf.

Die Gemeinsamkeit der Mutante HG778 mit Agip53 bezieht sich auf die starke Stimulation der meisten getesteten RNAs durch cAMP-Pulse. In beiden Stämmen sind RNAs pulsabhängig exprimiert, die bei AX2 auch ohne externe cAMP-Pulse ansteigen (bes. P23E4, A11H2, RD; siehe Tab. 2 und Diskussion 6.2.).

	AX2				HG778			Agip53			HG592	
	1	2	3	4	1	5	4	1	5	4	6	7
P52H11	+++	<u>decr</u>	0	o	<u>±±</u>	<u>decr</u>	o	nb	nb	nb	+	nb
cUbi1&2	<u>+++</u>	<u>decr</u>	0	o	<u>±±</u>	<u>decr</u>	o	nb	nb	nb	+	<u>decr</u>
A11B6	++	2	2-6	o	++	o	o	(+)	(+)	o	+	3t
P26E8	±±	<u>4p</u>	<u>6p/8p</u>	<u>0</u>	(+)	o	(+)	±	±	±	±	konst.
A2C5	±	4	<u>6p</u>	(+)	±	(+)	±±	±	±	m/s	±	li
P23E4	(+)	2	4/6	o	±	±±	±	±	±	m/s	±	li
A11H2	(+)	4	6/8	o	±	(+)	±±	(+)	+	m/s	±	li
RD	(+)	4	4/6	o	±	±±	±±	nb	nb	nb	±	li
cUbi5&6	(+)	2	8	o	±	±	inh	nb	nb	nb	±±	<u>decr</u>
cUbi3&4	(+)	2	<u>8p</u>	±	±	o	±	nb	nb	nb	±±	<u>decr</u>
csA	o	2	4-8	o	±	(+)	±±	o	±	m/s	±	li
M7E5	o	4	<u>4p</u>	±	o	±	±±	o	o	i	o	li
P29F8	o	4	6/8	o	±	±	±±	o	o	i	o	o
PD	o	2	4-8	±	+	++	++	nb	nb	nb	+	nb

Tab. 2:

Zusammenfassung der Daten aus der Genexpressionsanalyse der Stämme AX2, HG778, Agip53 und HG592.

1 = Vorhandensein der RNA bei t_0 , 2 = erster Anstieg (Zeit in Stunden), 3 = Maximale Expression während der Entwicklung (Stunden), 4 = Pulseffekte, 5 = Anstieg ohne exogene cAMP-Pulse, 6 = Vorhandensein in der frühen Wachstumsphase 3×10^5 Zellen/ml, 7 = Maximale Expression während der Wachstumsphase.

decr = abnehmend, o = nicht vorhanden, (+) schwach, + = deutlich, ++ = stark ausgeprägt, a = Beschleunigung des Anstiegs, m/s = verstärkte und verlängerte Expression, i = Induktion, nb = nicht bestimmt.

Daten, die durch Abbildungen belegt sind, sind durch Unterstreichen gekennzeichnet.

6.2. DISKUSSION

Das Mutanten-Screening nach dem Kolonieblot-Verfahren hat sich als wirkungsvolle Methode erwiesen, Minus-Mutanten für spezielle Proteine zu isolieren. Bisher konnten mehrere Mutanten gefunden werden, die konstitutiv exprimierte Cytoskelettproteine nicht mehr synthetisieren (α -Actinin: Wallraff et al., 1986, Schleicher et al. 1988; 120kD-Gelationfactor: in prep.; Severin: in prep.) und eine Mutante, die das entwicklungsregulierte csA-Adhäsionsprotein nicht mehr bildet (Noegel et al., 1985). Bei entwicklungsregulierten Proteinen besteht ein Problem dieser Mutantenselektion darin, daß pleiotrope Mutanten miterfaßt werden, die wegen eines Entwicklungsblocks entwicklungsregulierte Proteine generell nicht exprimieren. Wir waren jedoch nicht an Mutanten mit komplexen Regulations-Defekten interessiert, sondern suchten Mutanten, die wegen eines Defekts im Strukturgen selbst die Regulatorische Untereinheit nicht mehr exprimieren können.

Für die Suche nach der csA-Mutante war ein Versuchsansatz gewählt worden, bei dem die meisten dieser "falschen Negativen" ausgeschlossen wurden, indem man bei der Mutagenese von dem entwicklungsregulierten Gene konstitutiv exprimierenden Stamm HG592 ausging (Noegel et al., 1985). Ein solches Verfahren war jedoch für die Regulatorische Untereinheit nicht wünschenswert, da wir bei den Minus-Mutanten nach Effekten auf die Entwicklung suchen wollten und deshalb nicht von bereits aberranten Stämmen ausgehen konnten.

Obwohl die Regulatorische Untereinheit in vegetativen Zellen in geringen Mengen vorhanden ist, erscheint sie im Kolonieblot wie ein strikt reguliertes Protein, da nicht zwischen spezifischer R-Markierung und Background unterschieden werden kann; dies ist erst im Immunoblot nach SDS-PAGE möglich.

Die Kolonien der gefundenen Mutante weisen eine Markierung auf, die der von nichtaggregierenden Mutanten entspricht. Die Mutante HG778 ist zwar morphologisch stark aberrant, jedoch zur Bildung von Aggregaten und Fruchtkörpern fähig. Die Mutante ist außerdem charakterisiert durch das Fehlen autonomer Lichtstreuungs-Oszillationen, durch stark reduzierte Lichtstreuungsänderungen als Antwort auf extrazelluläre cAMP-Stimuli und durch eine reduzierte cGMP-Antwort.

Immunoblots mit Bakterien-gezogenen Zellen zeigten erstens, daß vegetative und in Suspension entwickelte Zellen eine deutlich reduzierte Menge an Regulatorischer Untereinheit aufweisen, zweitens aber, daß die Mutante HG778 in der Lage ist, Regulatorische Untereinheit von normalem Molekulargewicht zu bilden und nach Beginn der Entwicklung zu induzieren.

Mögliche Ursachen für die Reduktion der Regulatorischen Untereinheit in der Mutante HG778

Da alle untersuchten entwicklungsregulierten Proteine (csA, A2C5) und RNAs in der Mutante voll exprimiert werden können, kann die geringe Menge an Regulatorischer

Untereinheit in entwickelten Zellen nicht die Folge eines allgemeinen Entwicklungsblocks sein. Um Ursachen für die Reduktion der Regulatorischen Untereinheit zu suchen und deren Entwicklungsabhängigkeit zu charakterisieren, wurden die RNA-Expressionsanalysen durchgeführt.

Diese Untersuchungen zeigten, daß die geringen Mengen der Regulatorischen Untereinheit nicht auf verminderte Transkriptionseffizienz zurückzuführen sind. Die mRNA wird in normalen Mengen exprimiert und unterscheidet sich auch in der Größe nicht von der des AX2, die Transkription bricht also nicht vorzeitig ab.

Durch den Vergleich der Expressionsmuster verschiedener entwicklungsregulierter Gene wurde gefunden, daß (1) die Mutante klare Defekte in der Genregulation aufweist (siehe unten), daß (2) die RNA der Regulatorischen Untereinheit in der Mutante aber mit den gleichen RNA-Spezies (A2C5, P23E4, A11H2) coreguliert ist wie im Wildtyp AX2; Promotordefekte im Gen der Regulatorischen Untereinheit können deshalb ausgeschlossen werden.

In Bezug auf Größe, Menge und Regulation konnten also keine spezifischen Defekte der Regulatorischen Untereinheit nachgewiesen werden. Die Tatsache, daß nur bei der Regulatorischen Untereinheit einer normalen Menge an mRNA eine Reduktion auf Proteinebene gegenübersteht, kann als Hinweis auf mRNA-spezifische Translationsdefekte oder Instabilität des Proteins angesehen werden.

Das Pulssystem der Mutante HG778

Wie in der Mutante Agip53 konnten auch in der Mutante HG778 im Lichtstreuungsexperiment keine autonomen Oszillationen festgestellt werden. Auch bei der Genregulation verhält sich die Mutante HG778, als würde sie wie die Mutante Agip53 keine Pulse produzieren. Die Genexpressionsmuster beider Mutanten gleichen sich: In beiden Stämmen wird die Expression entwicklungsregulierter RNAs durch cAMP-Pulse stark gefördert, die im Elternstamm AX2 auch ohne externe cAMP-Pulse ansteigen (bes. P23E4, A11H2, RD; siehe Tab. 2). Deshalb konnte wie in Agip53 auch in HG778 kein normaler cAMP-Relay erwartet werden.

Die Messungen des cAMP-Relays und der cGMP-Antworten ergaben jedoch in der Mutante HG778 das dem Stamm Agip53 entgegengesetzte Verhalten: Während die cGMP-Antwort stark reduziert war, entsprach der cAMP-Relay dem von AX2. Daß bei normalem cAMP-Relay in der Mutante HG778 keine spontanen Oszillationen nachgewiesen werden konnten, ist überraschend. Die als Indikator für Oszillationen untersuchte Lichtstreuungsantwort, die auf Kontraktion der Zellen nach einem cAMP-Stimulus beruht, wird durch die intrazelluläre cGMP-Antwort vermittelt, die im Wildtyp eng an das cAMP-Oszillationssystem gekoppelt ist. In einer Mutante mit defekter cGMP-Antwort

spiegelt das Fehlen der Lichtstreuungsoszillationen wahrscheinlich die Reduktion der cGMP-Antwort wider, nicht jedoch das Fehlen der sie auslösenden cAMP-Pulse.

Die starken Effekte von cAMP-Pulsen auf die Genexpression des Stammes HG778 sind unerwartet bei einer Mutante, die Defekte der Regulatorischen Untereinheit aufweist. Eine Abwesenheit der Regulatorischen Untereinheit könnte zu einer konstitutiven Freisetzung der Katalytischen Untereinheit und damit einer hohen cAMP-unabhängigen Kinaseaktivität führen. Eine alternative Möglichkeit besteht darin, daß wegen der Koregulation der beiden Untereinheiten auch die Katalytische Untereinheit nur vermindert exprimiert wird. Dann kann auch durch cAMP-Stimulation kein Wildtypniveau an Kinaseaktivität erreicht werden. Beide Hypothesen sagen zwar unterschiedliche Effekte auf die Kinaseaktivität voraus, doch in beiden Fällen ist bei Abwesenheit der Regulatorischen Untereinheit die Aktivität der cAdPK cAMP-unabhängig.

Die Tatsache, daß die Regulatorische Untereinheit in der Mutante HG778 nicht vollständig eliminiert ist, kompliziert diese Überlegungen. Im Falle der gleichzeitigen Reduktion der Katalytischen Untereinheit könnte dies zu einer Umkehrung der Effekte führen, sodaß mehr cAMP benötigt wird, um die reduzierte Menge an Katalytischer Untereinheit vollständig freizusetzen und so eine Kinaseaktivität zu erreichen, die nicht dem voll aktivierten Zustand im Wildtyp entspricht, aber unter Umständen ausreicht cAMP-Effekte zu vermitteln.

Dennoch waren die Befunde zur Pulsstimulation der meisten Klone in der Mutante HG778 unerwartet. Als einziger Klon, dessen RNA keine Pulseffekte zeigte, stellt A11B6 eine Ausnahme dar (s.u.).

Regulation der Genexpression in Stämmen mit defektem cAMP-Relay (Agip53) oder defekter cGMP-Antwort (HG778)

Neben der Reduktion der Regulatorischen Untereinheit als Ursache für Defekte der Genregulation in der Mutante HG778 muß man die Möglichkeit in Betracht ziehen, daß Änderungen im $IP_3 \rightarrow Ca^{++} \rightarrow cGMP$ -Signaltransduktionsweg, die zu einer Reduktion der cGMP-Antwort führen, weiterreichende Folgen für die Differenzierung der Mutanten haben könnten als bisher angenommen. cGMP fungiert nicht nur als second Messenger der Chemotaxis (Wurster et al., 1977; Ross & Newell, 1981; Europe-Finner et al., 1985; Liu & Newell, 1988), sondern kommt auch als Regulator der Expression einiger Gene in Frage (van Haastert et al., 1982; Lappano & Coukell, 1982).

In diesem Sinne können auch die Ergebnisse der Expressionsversuche mit der Mutante Agip53 interpretiert werden. Es handelt sich um eine "nichtaggregierende" Mutante, deren Defekt weitgehend durch exogenes cAMP aufgehoben werden kann (Darmon et al., 1975; 1977). Darmon et al. (1975) konnten zeigen, daß diese "Rettung" von Agip53 pulsabhängig ist und mit einem kontinuierlichen Fluß von cAMP nicht erreicht werden kann.

Die Ursache für den Phänotyp der Agip53 liegt in der Adenylatcyclase: Die Mutante kann die Adenylatcyclase während der frühen Entwicklung zwar normal induzieren, d.h. sie zeigt einen normalen Anstieg der Basalaktivität und auch der extrazelluläre cAMP-Spiegel steigt während der Entwicklung (Klein, 1976). Sie kann die Enzymaktivität der Adenylatcyclase nach cAMP-Pulsen aber nicht über die Basalaktivität hinaus steigern, entwickelt deshalb keine spontanen Oszillationen, ist nicht zum Relay exogener cAMP-Signale fähig und führt keine intrazellulären cAMP-Oszillationen durch (Wurster & Bumann, 1981). Wenn man das Fehlen der Relay-Antwort durch exogene cAMP-Pulse kompensiert, kann man normale Entwicklung bis zur Aggregationsreife induzieren (Juliani & Klein, 1978) und die Zellen in Mischkulturen mit Wildtypzellen sogar zur Sporulation bringen (Darmon et al., 1979). Dies führte zu dem Schluß, daß die in der Mutante fehlenden intrazellulären cAMP-Oszillationen für die Differenzierung nicht benötigt werden.

Während alle anderen in den hier durchgeführten Experimenten benutzten Klone diese Interpretation stützen, gilt dies nicht für den Klon A11B6, da die korrespondierende RNA als einzige in der Mutante Agip53 nicht durch externe cAMP-Stimuli induziert werden kann. Dieser Befund kann als Hinweis auf eine Regulation der A11B6-RNA durch intrazelluläres cAMP gewertet werden, da der Defekt der Adenylatcyclase, der zu einem Fehlen intrazellulärer Oszillationen führt, durch extrazelluläre cAMP-Pulse nicht kompensiert werden kann.

Einen vergleichbaren Befund stellt die Repression der in vegetativen Zellen vorhandenen RNA des Klones M4-1 während der Entwicklung von Wildtypzellen dar. Diese Repression kann durch extrazelluläre cAMP-Pulse veranlaßt werden, findet jedoch nicht statt, wenn man die Adenylatcyclase mit Coffein hemmt und dadurch die intrazelluläre cAMP-Antwort blockiert (Kimmel, 1987). Der cAMP-Effekt läßt sich bei M4-1 im Gegensatz zu anderen RNA-Spezies (Mann & Firtel, 1987) in coffeinbehandelten Zellen nicht durch extrazelluläres cAMP hervorrufen.

Die Mutation der Agip53 entspricht in ihren Auswirkungen auf den cAMP-Relay dem Verhalten coffeinbehandelter AX2-Zellen (Kimmel, 1987) und der Klon A11B6 ist der einzige der verwendeten entwicklungsregulierten Klone, für dessen RNA auch ein inhibierender Effekt von Coffein in AX2 nachgewiesen werden konnte (Westphal, pers. Mitt.). In der Mutante HG778 läßt sich ebenfalls keine Steigerung der Expression der A11B6-RNA durch cAMP-Pulse nachweisen. Im Gegensatz zur Mutante Agip53, bei der diese RNA kaum nachweisbar ist, wird in HG778 die RNA jedoch auch ohne cAMP-Pulse im Mengen gebildet, die dem induzierten Niveau in AX2 entsprechen. Dies entspricht der Interpretation, daß (1) in Agip53 die cAdPK wegen der fehlenden intrazellulären cAMP-Pulse nicht aktiviert werden kann, und die vermutlich cAMP-abhängige A11B6-RNA nicht induziert wird, daß (2) in der Mutante HG778 die Katalytische Untereinheit wegen der Reduktion der Regulatorischen Untereinheit auch ohne cAMP-Stimulation aktiv ist und der Klon A11B6 deshalb konstitutiv exprimiert wird.

Bei allen anderen Klone können jedoch intrazelluläre cAMP-Oszillationen nicht für die Induktion der RNA verantwortlich sein, es müssen also andere intrazelluläre Messenger beteiligt sein. Diese Schlußfolgerung kann sogar noch erweitert werden: Da der Entwicklungsanstieg der vermehrt exprimierte RNAs (P26E8, P23E4, A2C5) während der frühen Entwicklung (t_2) in den ungepulsten Kulturen der Mutante Agip53 nicht von dem der gepulsten Zellen zu unterscheiden ist, kann für diesen Anstieg die Pulsstimulation nicht relevant sein. Auch die frühe Induktion des Phosphodiesteraseinhibitors und der Adenylatcyclase (Juliani & Klein, 1978) ist in Agip53 pulsunabhängig, ebenso die des in t_0 -Zellen abwesenden csA-Transkripts.

Dieses Phänomen war in Vorversuchen schon auf Proteinebene beobachtet worden: geringe Expression des entwicklungsregulierten csA-Proteins ohne Pulsstimulation. Der Stamm Agip53 wurde daher rekloniert und der cAMP-Relay-Phänotyp überprüft, um sicher zu sein, daß diese Expression in ungepulsten Kulturen nicht auf Revertanten in der Population zurückzuführen ist.

Die Tatsache, daß im Wildtyp bei der Stimulation von Chemotaxisantworten die exogenen cAMP-Pulse durch Folsäurepulse ersetzt werden können, war aus der Literatur bekannt (Wurster et al., 1979). Die Stimulation der csA-Expression in der Mutante Agip53, in der Folsäure nicht wie im Wildtyp intrazelluläre cAMP-Antworten hervorrufen kann, belegt, daß auch Prozesse der frühen Geninduktion ohne extra- und intrazelluläre cAMP-Pulse auskommen.

Welche Steuerfaktoren kommen neben intrazellulärem cAMP für die Signaltransduktion extrazellulärer cAMP-Pulse in der Mutante Agip53 in Frage? Die Effekte der Pulse beschränken sich auf eine spätere Zeitspanne (ab t_4), in der die Zellen die Fähigkeit erworben haben, auf externe Stimuli zu reagieren (Bumann et al., 1984). In dieser Phase führen cAMP-Pulse zu einer Beschleunigung des Anstiegs (P26E8, t_{24}), einer verstärkten Akkumulation und verlängerten Anwesenheit der Transkripte (P23E4, A2C5, csA) sowie einer Neuinduktion der RNA (P29F8, M7E5).

In dieser Entwicklungsphase sind die Komponenten des Antwortsystems auf cAMP-Pulse voll entwickelt, die Stimulierung führt zu einer völlig normalen cGMP-Antwort der Agip53 und daher auch der vorausgehenden IP_3 - und Ca^{++} -Antworten. Es muß daher in Betracht gezogen werden, daß Komponenten der IP_3 -Signaltransduktionskette oder noch unidentifizierte Signale Messengerfunktionen in der Regulation der Genexpression ausüben. Diese Interpretation wird noch erhärtet durch Befunde von Bozzaro et al. (1987) an der Mutante HSB1, die bis in Details der Agip53 ähnelt.

Andererseits ist auch die Mutante HG778, die Defekte in der cGMP-Antwort aufweist, in der Lage auf externe cAMP-Stimuli zu antworten. Man könnte also spekulieren, daß nur die der cGMP-Antwort vorgeschalteten IP_3 - und Ca^{++} -Reaktionen - und nicht cGMP selbst - zusätzlich zu intrazellulärem cAMP in die frühe Genregulation eingreifen.

Zwei Punkte bezüglich der cDNA-Klone sind bei dieser Diskussion noch zu berücksichtigen. Erstens zeigte sich im Verlauf der Untersuchungen, daß die Einteilung in Klassen entwicklungsregulierter RNAs eine relativ willkürliche Setzung der Grenzen

erfordert. Bei genauer Analyse der Expressionsmuster in verschiedenen Mutanten erweist sich, daß fast keine RNA der anderen in ihrer Regulation gleicht (Tab.). Eine Ausnahme hiervon stellt nur die Gruppe um die Regulatorische Untereinheit dar (A2C5, A11H2, P23E4). Aus dieser Heterogenität kann geschlossen werden, daß die Steuerprozesse komplex sind und sich nicht durch einen einzigen Regelmechanismus erklären lassen.

Zweitens erkennen alle in diesen Experimenten verwendeten cDNA-Klone im Präaggregations- und im Aggregationsstadium exprimierte RNAs. Die RNAs der "späteren" Klone (csA, P29F8, M7E5) werden in filterentwickelten Zellen bei t_9 (Aggregation) stark induziert, nehmen bei t_{12} (Mounds) schon wieder ab und sind bei t_{15} (tips) schon nicht mehr detektierbar. Die oben genannten Schlußfolgerungen bezüglich der IP₃-Signaltransduktionskette können also nur für die Entwicklung bis zum Aggregationsstadium, die auch in Suspensionskultur vor sich geht, gezogen werden und müssen nicht für die nachfolgenden Phasen der Tipbildung, Slug-Migration und Kulmination gelten.

In der Literatur sind etliche Gene beschrieben, die für diese späten Entwicklungsstadien spezifisch und cAMP-induzierbar sind. Die meisten dieser Klone sind zusätzlich zelltypspezifisch. Analysen der Expressionsmuster dieser Klone zeigten auch hier ein hohes Maß an Heterogenität: unterschiedliche Zeitpunkte, an denen die Klone in vivo exprimiert sind; unterschiedliche Zeitpunkte, an denen sie mit cAMP induzierbar sind (Oyama & Blumberg, 1986); unterschiedliche Empfindlichkeiten gegen Behandlungen wie Dissoziation von Aggregaten und anschließende Stabilisation durch Zugabe von externem cAMP (Barklis & Lodish, 1983; Mehdy et al., 1983; Chisholm et al., 1984). Aber alle cAMP-Effekte konnten durch konstante, hohe cAMP-Spiegel erzielt werden und waren nicht pulsabhängig.

Unter diesen Klonen befinden sich einige, deren RNA-Expression deutliche Hinweise auf Regulation durch intrazelluläres cAMP geben (vergl. Einleitung und Diskussion der Transformanten).

In der Adenylatcyclase-defekten Mutante HSB1 konnte keine der getesteten postaggregativen RNAs durch externe cAMP-Pulse induziert werden (Bozarro et al., 1987), was als Hinweis darauf gewertet werden kann, daß für die Induktion dieser späten Gene eine aktive Adenylatcyclase und ein erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel nötig ist. Den einzigen Hinweis auf eine Beteiligung von intrazellulärem cAMP in Regulationsprozessen der frühen Entwicklung stellt die Repression des vegetativen Klones M4-1 (Kimmel, 1987) und die Induktion des Klons A11B6 dar.

Zusammenfassend kann man sagen:

1. Die RNA des Klons A11B6 wird anscheinend durch intrazelluläres cAMP reguliert.
2. In der frühen Entwicklung spielen intra- und extrazelluläre cAMP-Pulse keine ausschlaggebende Rolle für die Geninduktion (Ausnahmen M4-1- und A11B6-RNA). cAMP-Pulse sind ersetzbar durch Folat-Stimuli, die auch in der Chemotaxis aktiv sind.
3. Der IP₃-Signaltransduktionsweg kommt als Vermittler der Pulsstimulation früher Geninduktion in Frage.

4. In postaggregativen Entwicklungsphasen muß extrazelluläres cAMP nicht als Pulsstimulus appliziert werden, um seine Wirkung zu entfalten, sondern ist als konstanter Reiz wirksam.
5. Es gibt erst in späten Stadien Hinweise für eine Regelfunktion von intrazellulärem cAMP auf die Genexpression (Ausnahmen unter 2.).

Weiteres Vorgehen

Es wurden zwei Hinweise darauf gefunden, daß es sich bei der Mutation des Stammes HG778 um einen spezifischen Defekt der Regulatorischen Untereinheit handelt: (1) die Diskrepanz der Mengenverhältnisse von R-RNA zu R-Protein, (2) die Regulation der A11B6-RNA.

Es konnte aber kein Beweis erbracht werden, daß die anderen abnormen Eigenschaften der Mutante - Reduktion des cGMP-Antwort und defekte Genregulation der anderen RNAs - ihre gemeinsame Ursache in der Reduktion der Regulatorischen Untereinheit haben. Als alternative Erklärung kann auch die Reduktion der cGMP-Antwort der primäre Defekt der Mutation sein. Wie auch immer die kausalen Zusammenhänge sein mögen, eine Verknüpfung der Reduktion der Regulatorischen Untereinheit mit einer schwachen cGMP-Antwort wäre interessant, da sich Hinweise auf Knotenpunkte verschiedener Signaltransduktionsketten ergeben könnten. Es ist aber nicht ausgeschlossen, daß die verschiedenen Aberrationen der Mutante durch unabhängige Mutationen verursacht werden.

Da MNNG Punktmutationen induziert, die über Southern Analysen nur schwer nachweisbar sind, muß der Nachweis einer Mutation im Gen der Regulatorischen Untereinheit über Isolierung und Sequenzierung des mutierten Gens der Mutante HG778 geführt werden. Da ein genomischer Klon aus dem Wildtyp als Vergleich noch nicht zur Verfügung steht, wurde eine weitere Charakterisierung der Mutante nicht verfolgt.

Stattdessen wurden Versuche unternommen, "Mutationen" spezifisch im Gen für die Regulatorische Untereinheit zu induzieren und die Expression dieses Gens selektiv zu unterdrücken. Dies sollte durch Transformationsexperimente mit dem Vektor pDNeoII erreicht werden, der sowohl die Transkription von antisense-RNA steuert als auch zur Erzeugung von Gendisruption durch homologe Rekombination geeignet ist (Witke et al., 1987).

7. DICTYOSTELIUM-TRANSFORMATION

7.1. ERGEBNISSE

7.1.1. Vektorkonstruktionen

Für die Transformation mußte ein für die Regulatorische Untereinheit codierendes DNA-Fragment in den Transformationsvektor pDNeoII (Abb. 5) ligiert werden. Um Probleme mit der A/T-reichen-Extension des Klons RD10.1 (Abb. 4) zu vermeiden, sollte ein Fragment verwendet werden, das ausschließlich aus dem codierenden Teil des RD-Klons stammt. Es standen nicht viele Schnittstellen zur Verfügung, solche Fragmente zu erhalten; verwendet wurde das 670bp-Fragment zwischen der *EcoRV*- und der zweiten *DraI*-Schnittstelle.

Für die Ligation in den Transformationsvektor wurde der Vektor pUC8 des Klons RD10.1 mit *DraI* geschnitten. Die resultierenden Fragmente von 700, 980, 1030 und 1350bp wurden auf Agarosegelen aufgetrennt und die 980 und 1030bp Fragmente gemeinsam eluiert. Durch den anschließenden *EcoRV*-Verdau wird das größere Fragment, das den codierenden Teil enthält, weiter gespalten in 670- und 370bp-Fragmente, die sich gut von dem pUC8-Spaltstück abtrennen lassen.

Die beiden Enzyme *EcoRV* und *DraI* erzeugen blunt ends, die resultierenden

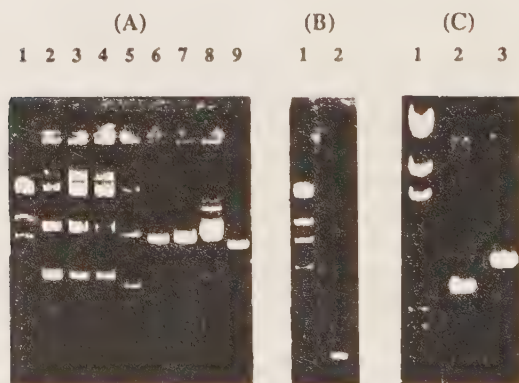


Abb. 36:

Identifizierung rekombinanter Plasmide. (A) pDNeoII, 1 = λ -Marker, 2+6 = pDNeo700/2, 3+7 = pDNeo700/1, 4+8 = pDNeo370, 5+9 = pDNeoII; , 2-5 *EcoRI* verdaut, 6-9 ungeschnitten; (B) 1 = λ -Marker, 2 = TN903-Insert des pBL2, *Bgl*II geschnitten (C) bGem4, 1 = λ -Marker, 2 = bGem4 ohne Insert, 3 = bGem4 mit 670bp RD-Insert, 2+3 *Bam*HI verdaut.

Fragmente müssen also in eine blunt-end-Schnittstelle des pDNeoII-Vektors ligiert werden. Die *SmaI*-Schnittstelle des pIC20H kann jedoch nicht benutzt werden, da wegen einer zusätzlichen Schnittstelle im *Dictyostelium*-Anteil des pDNeoII der Vektor in zwei Fragmente geschnitten wird. Deshalb wurde pDNeoII mit *EcoRI* linearisiert, die überhängenden Enden mit Klenow-Enzym aufgefüllt und dephosphoryliert.

Nach der Ligation wurde der Ansatz in den Stamm *E. coli* MC1061 transformiert und rekombinante Klone auf Ampicillinresistenz selektiert. Angewachsene Kolonien wurden auf ein regelmäßiges Raster überimpft, auf Nitrocellulose übertragen, lysiert und die Filter-gebundene DNA mit nicktranslatiertem RD10.1/*MaeIII* (800bp)-Fragment hybridisiert. Positive Klone wurden gepickt und nach Plasmid-Minipräparationen ein Größenvergleich mit dem leeren pDNeoII-Vektor vorgenommen (Abb. 36A).

Einige dieser Klone wurden zur Bestimmung der Insert-Orientierung ausgewählt. Weil in dem 670bp-Fragment keine asymmetrischen Schnittstellen zur Verfügung standen, mußten die Plasmide ansequenziert werden. Als Oligonukleotid zum Primen der Sequenzreaktion wurde der Beginn des Polylinkers ausgewählt, da die benachbarten Teile des Aktin-6-"Promotors" einige Basen des codierenden Teils des Aktin-6 enthalten, die mit denen des Aktin-15 identisch sind und sich deshalb nicht als Ansatzstelle des Primers eignen. Die 5'-flankierenden Teile des Promotors bestehen fast ausschließlich aus A- und T-Ketten, die ebenfalls ungünstig zum Anhybridisieren des Primers sind (Romans & Firtel, 1985).

Es wurde je ein Klon in sense (pDNeo670/2) und antisense-Orientierung (pDNeo670/1) konserviert.

Da die nicktranslatierten Proben der *EcoRI*-Inserts und der *MaeIII*-Fragmente des Klons RD10.1 in Northern-Blot-Analysen nur sehr schwache Signale ergaben, wurde die Sensitivität weiterer Hybridisierungsproben getestet. Auch mit kinasierten Oligonukleotiden konnte keine zufriedenstellende Markierung erreicht werden. Deshalb wurden Vektoren für Riboproben hergestellt. Die gleichen *EcoV-DraI*-Fragmente, die in den pDNeoII-Vektor ligiert wurden, wurden auch zum Inserieren in die *SmaI* Schnittstelle des bGem-4-Vektors verwendet. Die Vorbereitung der Fragmente und die Ligation erfolgte wie oben beschrieben, der Ligationsansatz wurde jedoch zur Transformation des *E. coli* Stammes JM109 eingesetzt und Transformanten mit Insert-haltigen Plasmiden auf Ampicillinplatten mit 20µg/ml IPTG und X-Gal selektiert. In dem ausgewählten Klon (Abb. 36C) wird vom T7-Promotor die anti-sense-RNA und vom SP6-Promotor die sense-RNA abgelesen. Das T7-Transkript wird also benutzt um vom Transformationsvektor stammende anti-sense RNA zu detektieren, das SP6-Transkript für die mRNA. Für die Southern-Analysen wurden das 1100bp *DraI*-Fragment und ein *AvaII-EcoRI* -Fragment eines kürzeren RD-Klons verwendet, sodass die Hybridisierungsprobe zwar fast den gesamten codierenden Bereich des Gens abdeckt, aber keine flankierenden Bereiche enthält;

Zum Nachweis des Neomycinresistenzgens und seiner Transkripte wurde das nicktranslatierte *BglIII* Insert (1400bp) des TN903 tragenden Vektors pBL2 verwendet (Abb. 36B).

7.1.2. Transformationen

Insgesamt wurden vier *Dictyostelium*-Transformationen durchgeführt, zwei mit dem Vektor pDNeo670/1, der das 670bp Insert in antisense-Orientierung enthält und sowohl Gendisruption als auch antisense-Effekte verursachen kann, eine mit pDNeo670/2 mit dem Insert in sense-Richtung, was ausschließlich zu Gendisruption führen kann und eine ohne Insert als Negativkontrolle.

Eine Woche nach der Transformation waren in den Submerskultur-Petrischalen so viele Klone angewachsen (ca. 500-1000), daß das übliche Überimpfen einzelner Kolonien in Costarplatten nicht zweckmäßig war. Deshalb wurden die Zellen einer Platte möglichst vollständig abgeschwemmt, gezählt, verdünnt und direkt aus dieser Suspension heraus kloniert. Dieses Verfahren birgt den Nachteil, daß man keine Aussagen über die Unabhängigkeit gefundener Transformanten machen kann, doch ermöglicht es relativ rationell Transformationen mit hoher Ausbeute an G418-resistenten Klonen vollständig durchzutesten.

SM-Platten wurden mit 100, 300, 1000 und 3000 gezählten Zellen angeimpft und nach 3 Tagen Wachstum von den Platten, auf denen die angewachsenen Kolonien gut getrennt lagen, auf ein regelmäßiges Raster überimpft. Bei diesem Klonierungsschritt lag die Anwachsrate zwischen 20 und 30%, da sich nach der Selektion mit G418 noch ein Anteil toter Zellen in den Kulturen befand.

Unter den Transformanten mit pDNeoII waren keine morphologisch defekten Transformanten aufgefallen, und bei der Transformation mit dem Vektor pDNeo670/2, der das Insert in sense-Orientierung enthält, konnte unter 1000 im Western-Kolonieblot mit dem mAb 80-386-10 getesteten Klonen keiner mit reduzierten Mengen an Regulatorischer Untereinheit identifiziert werden.

Bei der ersten Transformation mit pDNeo670/1 (mit Insert in anti-sense Orientierung) wurden 3000 Klone getestet. Unter diesen 3000 Klonen befanden sich ca. 2% klar als morphologisch aberrant erkennbare Kolonien:

- a) Nichtaggregierende Mutanten, die schwache "ripples" bildeten (9-30, 33-18, 32-15, 11-33)
- b) eine Mutante, die nicht über das "mound" Stadium hinauskam (10-18)
- c) "streamer" Mutanten mit großen aufspaltenden Aggregaten (z.B. 4-5)
- d) Mutanten mit chaotischer Aggregation und Fruchtkörperbildung (etliche)
- e) Mutanten mit extrem kurz gestielten Fruchtkörpern und hoher Reversionsrate (z.B. 19-53, 5-25)
- f) ein Klon, der beim ersten Überprüfen der Koloniemorphologie als kurzstieliger Klon registriert worden war, nach dem ersten Überimpfen seinen Phänotyp aber drastisch geändert hatte (s.u.): in einem homogenem Rasen nicht aggregierender Zellen fanden sich sehr selten normal proportionierte Fruchtkörper. Dieser Klon zeigt eine starke Tendenz, weiter zum AX2-Phänotyp zu revertieren (13-5).

Diese morphologischen Typen traten mit einer Häufigkeit von 1-6 Klonen pro Gruppe auf; bei einer Primärkoloniezahlanzahl von ca. 500 und einer Anzahl getesteter Klone von 3000 läßt dies den Schluß zu, daß ähnliche Klone von der gleichen Primärkolonie abstammen, d.h. daß sie auf ein einmaliges Transformationsereignis zurückzuführen sind.

Die meisten der morphologisch aberranten Klone zeigten im Kolonieblot normale Markierung mit dem R-spezifischen Antikörper 80-386-10 (Typ b, c, d), Ausnahmen hiervon stellten wie erwartet (vergl. 5.2.) die nichtaggregierenden und die Klone mit kurzstieligen Kolonien sowie der Klon 13-5 dar. Diese Klone fielen durch ihre im Vergleich zum Wildtyp reduzierte Markierung auf (Abb. 37).

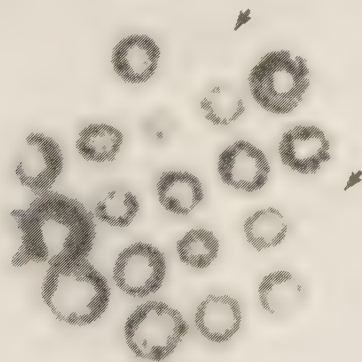


Abb. 37:

Kolonieblot mit pDNeo670/1-Transformanten, zwei Kolonien (5-25, 13-5) mit reduzierten Label der ^{125}J -mAb 80-386-10 sind mit Pfeilen markiert.

Die Kolonieblots ermöglichen keine Entscheidung, ob keine oder wenig Regulatorische Untereinheit produziert wird, da geringe Mengen im Background verschwinden, der durch unspezifische Antikörperbindung verursacht wird. Deshalb wurden die Ergebnisse in Immunoblots nach SDS-PAGE überprüft.

Bei den nichtaggregierenden Klonen 9-30 und 32-15 konnte in vegetativen Zellen eine drastische Reduktion der Regulatorischen Untereinheit festgestellt werden. Auch nach Beginn der Entwicklung erreichen diese beiden Klone nicht das Niveau vegetativer Wildtypzellen. Dasselbe gilt für den selten sporulierenden Stamm 13-5. Bei den kurzgestielten Transformanten sind die Mengenänderungen der Regulatorischen Untereinheit nicht so ausgeprägt, aber dennoch deutlich (Abb. 38). Bei diesem Mengenvergleich muß man aber berücksichtigen, daß alle kurzstieligen Transformanten instabil sind (s.u.), die Proben also von Mischpopulationen stammen.

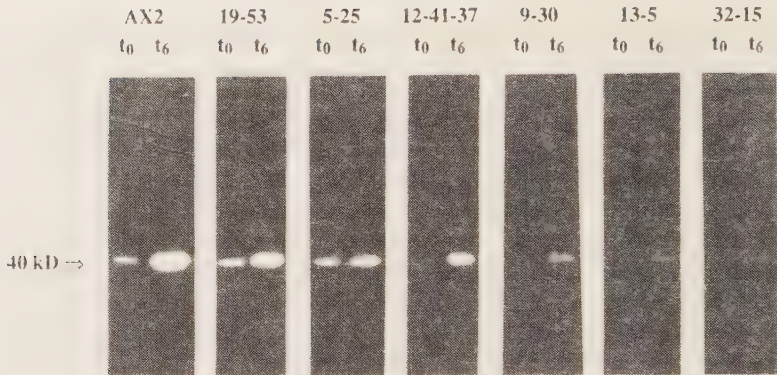


Abb. 38:
Kontaktabzüge von Westernblots der Transformanten mit ^{125}J -mAb 80-386-10. Die Stämme wurden auf Bakterien gezogen (t₀) und 6h in Suspension entwickelt (t₆). 19-53, 5-25 und 12-41-37 sind kurzstielige Transformanten; 11-33, 13-5 und 32-15 zeigen einen nichttaggregierenden Phänotyp.

Aus zwei Gründen wurde eine weitere Transformation mit dem antisense-Vektor durchgeführt: Erstens war nicht auszuschließen, daß die Instabilität der Klon eine zufällige Eigenheit eines einzelnen Transformationsereignisses darstellt; zweitens sollte untersucht werden, inwieweit die unterschiedlichen morphologischen Veränderungen in unabhängigen Transformationen reproduzierbar sind.

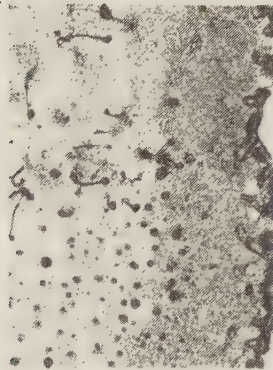
In der zweiten Transformation mit pDNeo670/1 konnte unter 1000 getesteten Klonen nur ein einziger gefunden werden, der im Kolonieblot reduzierte Antikörper-Markierung zeigte. Dieser Klon (12-41-37) gehört zu der Gruppe der kurzgestielten Transformanten: Er ist morphologisch nicht von den kurzstielligen Klonen der ersten Transformation zu unterscheiden (vergl. Abb. 41) und teilt mit ihnen auch die Eigenschaft der Instabilität.

7.1.3. Reversionen

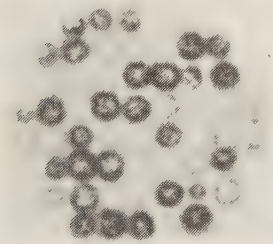
Reversionen sind gekennzeichnet durch ein Wiedererscheinen der Regulatorischen Untereinheit in Kolonie-Blots, das von morphologischen Veränderungen begleitet ist, die die Revertanten wieder dem Wildtyp angleichen (Abb. 39). An diesem veränderten Phänotyp können die Revertanten erkannt werden:

300 Kolonien des Stammes 5-25 wurden aufgrund ihrer Morphologie als "Transformanten" oder "Revertanten" klassifiziert und mit dem Kolonieblot die Mengen an Regulatorischer Untereinheit überprüft. In allen Fällen korrelierte der kurzstiellige Phänotyp mit reduzierten Mengen an R und die Wildtypmorphologie mit

(1A) 5-25



(1B) 13-5



(2A)



(2B)

Abb. 39:

Die Reversionen der Stämme 5-25 (A) und 13-5 (B) zur Wildtypmorphologie (oben im Photo) sind begleitet vom Wiedererscheinen der Regulatorischen Untereinheit (getestet im Kolonieblot mit ^{125}J -mAb 80-386-10). (2A) zeigt eine Mischpopulation nach dem Klonieren, (2B) zeigt die Sektorenbildung einer wachsenden Klonie, in der schnellerwachsende Revertanten überhandnehmen

Wildtypexpression von R. In der Kategorie der Fraglichen befanden sich die Klone die zum Zeitpunkt des Tests noch zu klein waren, um die Morphologietypen sicher unterscheiden zu können, und Zwischenformen, die wahrscheinlich auf Mischpopulationen zurückzuführen sind.

Versuche, durch oftmaliges Überimpfen nichtrevertierter Sektoren stabile Transformanten zu selektionieren, waren erfolglos. Um Reversionen zu unterdrücken, wurde deshalb versucht, die Klone auf Neomycin-haltigem Agar zu kultivieren. Dazu wurde der Bakterienstamm *E. coli* B/2, der für die Ko-Kultur mit *Dictyostelium* verwendet wird, mit dem die Neomycinresistenz-tragenden Plasmid pBL2 transformiert. Die gefundenen Bakterien-Transformanten tolerieren bis zu 100µg/ml G418 (maximal getestete

Konzentration). Die *Dictyostelium*-Zellen wurden bei 50 µg/ml G418 gezogen, da es sich zeigte, daß der nichttransformierte Wildtyp AX2 bei 20 µg/ml G418 in der Lage ist, winzige Kolonien zu bilden, die erst nach einem Tag das Wachstum einstellen. Transformierte Klone tolerierten bis zu 100 µg/ml G418, die Generationszeit war dann jedoch verlängert.

Während diese permanente Selektion keinen Einfluß auf die Wildtypmorphologie von pDNeoII-transformierten Kontroll-Zellen hat, waren bei den Transformanten 5-25 und 12-41-37 deutliche Effekte erkennbar. Die Selektion auf G418-Resistenz reduzierte die Reversionsrate deutlich, es kam erheblich seltener zu Sektorbildungen, aber nicht zur völligen Unterdrückung der Reversionen.

Alle Analysen, besonders die, für die große Zellzahlen benötigt werden, mußten daher zwangsläufig mit Mischkulturen vorgenommen werden. Um das Arbeiten mit möglichst sauberen Kulturen zu gewährleisten, wurden vor jedem Versuch die Stammkulturen frisch kloniert, getestet und die Kulturen für je einen Versuch von einer negativen Kolonie angeimpft. Für manche Versuche wurde der Anteil an Revertanten in der verwendeten Population bestimmt.

7.1.4. Morphologische Charakterisierung der Transformanten

Die Kolonie-Morphologie der Transformanten ist in Abb. 40 und 41 gezeigt. Die Klone 5-25 und 13-5 wurden auf Eigenschaften des cAMP-Turnover getestet (Abb. 40). Sowohl Coffein, das die Aktivierung der Adenylatcyclase verhindert, als auch cAMPS, das Rezeptorfunktionen stört, inhibieren die Entwicklung des Wildtyps AX2: Auf Coffein-haltigem Agar (5mM) bleiben AX2 Zellen im mound-Stadium stehen; auf cAMPS-haltigem Agar (5×10^{-7} , 2×10^{-6} , 1×10^{-5} M) ist die Entwicklung vollständig blockiert, erst nach einigen Tagen findet man winzige Fruchtkörper, besonders bei der höchsten Konzentration an cAMPS (Rossier et al., 1978).

Im Gegensatz zu diesen bei AX2 beobachteten Effekten ist der Klon 13-5 resistent gegen Coffein: Er bildet aus den entstehenden mounds kleine Slugs und Fruchtkörper mit lebensfähigen Sporen, er ist jedoch sensitiv gegenüber allen getesteten cAMPS-Konzentrationen.

Der Klon 5-25 wird durch cAMPS weit weniger inhibiert als der Wildtyp, er bildet bei allen cAMPS-Konzentrationen annähernd normale Fruchtkörper, unter deren Sporen sowohl Transformanten als auch Revertanten zu finden sind. Auf Coffein reagiert dieser Klon wie der Wildtyp.

In den kurzstieligen Transformanten 5-25 und 12-41-37 waren die Proportionen von Stielzellen zu Sporen zugunsten der Sporen verschoben (Abb. 41). Eine solche Verschiebung kann während der Kulmination, also bei der terminalen Differenzierung vor sich gehen oder durch vorausgehende Defekte bei der Regulation der Proportionen von Vorläuferzellen im Slug verursacht werden.

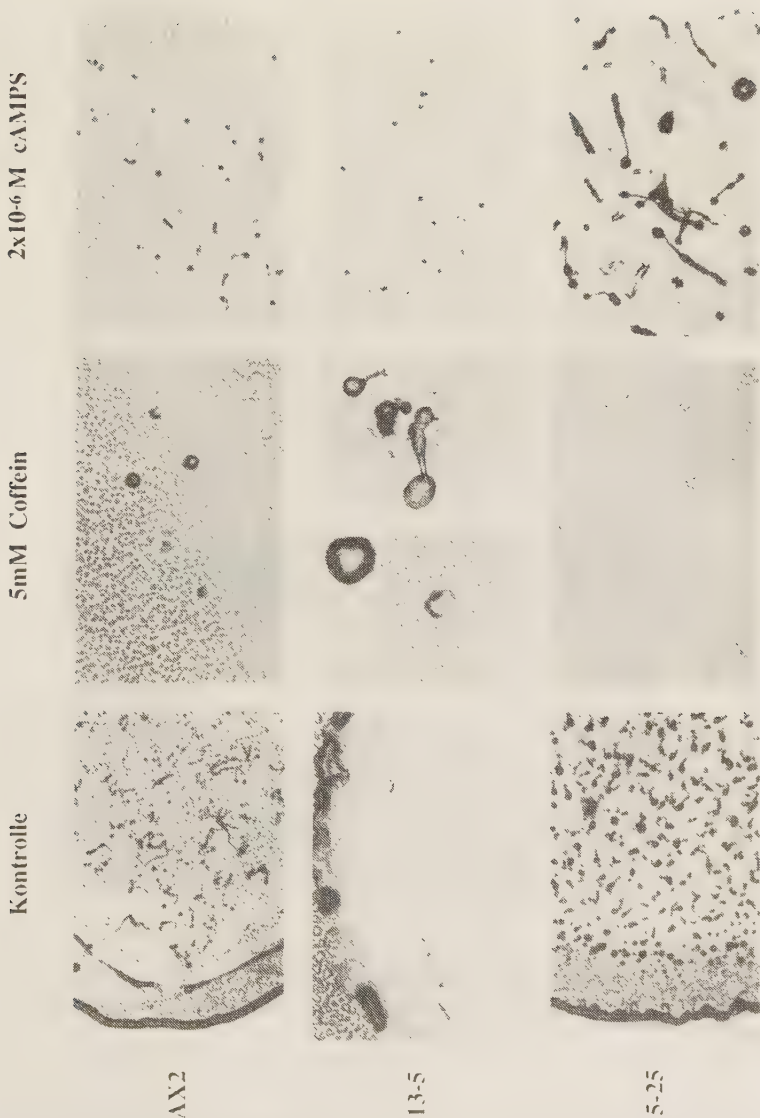


Abb. 40:
Test auf Coffein- und cAMPS-Resistenz der Transformanten 5-25 und 13-5; AX2 als Negativkontrolle. Die Klone wurden auf Drogen-haltigem Normalagar mit *E. coli B/2* angeimpft und einige Tage kultiviert.

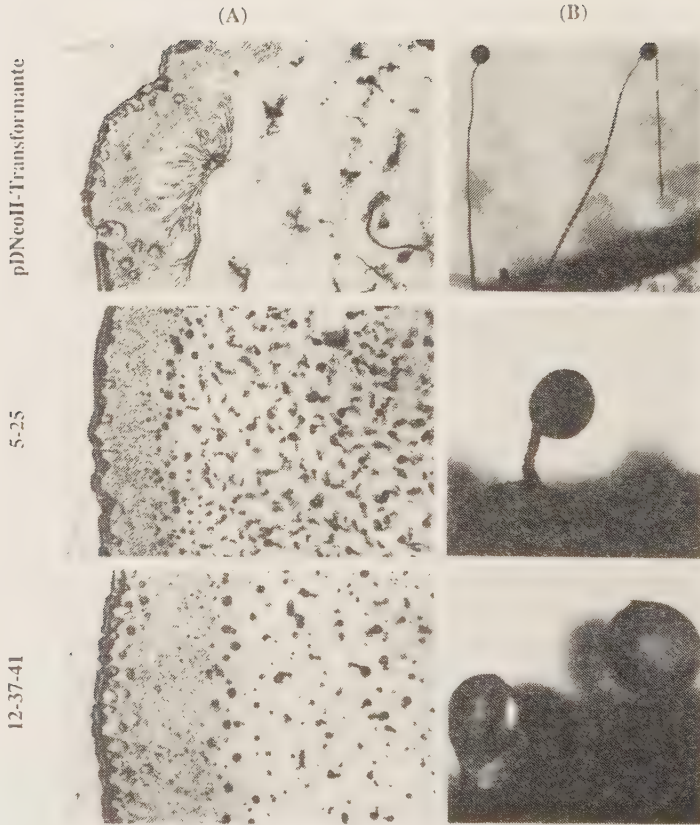


Abb. 41:
Morphologie der kurzstieligen Transformanten 5-25 und 12-41-37 und einer pDNeoII Kontrolltransformante auf G418-haltigem Normalagar (50µg/ml). (A) Koloniemorphologie, (B) Fruchtkörper.

Um diese Frage zu klären, wurden Zellen von AX2, einer Kontroll-Transformante mit pDNeoII und der beiden pDNeo670/1-Transformanten in einer dichten Suspension von *Klebsiella aerogenes* so verdünnt, daß in 5µl Tropfen auf Phosphatagar nur wenige Klone anwachsen. Von solchen Kolonien wurden Slugs einzeln vom Agar abgenommen, die Zellen mit Cellulase vereinzelt, mit Formaldehyd fixiert und auf kollagenbeschichtete Objektträger zentrifugiert. Diese Präparate wurden mit dem Präspor-spezifischen

monoklonalen Antikörper Mud1 und FITC-gekoppelten Schaf-anti-Maus-IgG-Antikörpern markiert. Die Ergebnisse der Auszählung fluoreszierender und nicht-fluoreszierender Zellen (Abb. 42) sind in Tabelle 3 und Abb. 43 dargestellt: Der Anteil der nicht-markierten Prästiel- und Anterior-like-Zellen war in den Transformanten 5-25 und 12-41-37 gegenüber dem Wildtypprozentsatz von 20% auf die Hälfte reduziert.

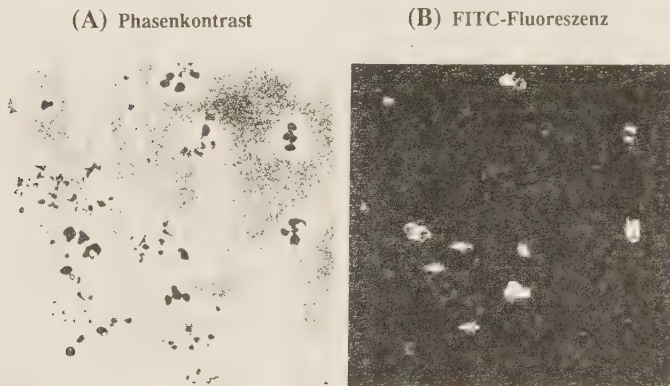


Abb. 42:

Phasenkontrast und FITC-Fluoreszenz dissoziierter Slugzellen, Prästiel-Zellen sind fluoreszent, Prästiel-Zellen, bzw. Anteriorlike-Zellen sind nur im Phasenkontrast zu erkennen (mit Pfeilen markiert in der Fluoreszenz-Aufnahme).

Stamm	Slugs	Zellen	Psp	Pst	% Pst
AX2	9	4492	3609	883	19.6
pDNeoII	2	1065	833	232	21.8
5-25	2	933	844	93	10.0
12-41-37	7	2294	2061	233	10.2

Tab. 3: Anteil nichtfluoreszierender Zellen an der Gesamtpopulation.

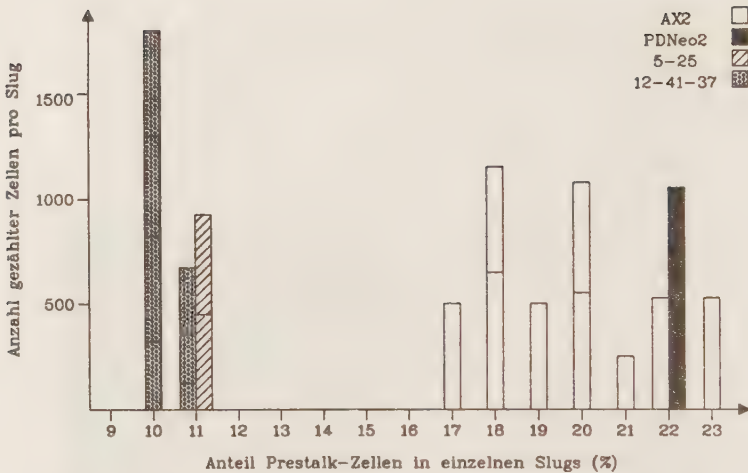


Abb. 43:

Zelltypproportionen in einzelnen Slugs der Transformanten 5-25 und 12-41-37, des Stammes AX2 und einer pDNeoII-Kontrolltransformante.

7.1.5. Molekularbiologische Charakterisierung der Transformanten

Um die in den Transformanten beobachteten Effekte erklären zu können, wurden RNA- und DNA-Analysen durchgeführt.

7.1.5.1. Northern-Blots

Die RNA-Analysen zeigten deutliche Abnahmen der RNA-Mengen (besonders bei den Klonen 19-53, 11-33, 13-5) und abnorme RNA-Größen (5-25, 32-15, 19-53). In den Klonen 5-25 und 32-15 wurden mehrere in AX2 nicht vorhandene Banden gefunden, die entweder kleiner oder größer waren als die Wildtyp-mRNA. Im Klon 19-53 konnte eine zusätzliche größere RNA nachgewiesen werden. Neben diesen aberranten RNAs konnte jedoch in allen Transformanten mit Ausnahme von 13-5, bei der die RNA-Mengen unter der Nachweisgrenze lag, die Wildtyp RNA-Spezies nachgewiesen werden (Abb. 44). Die 700bp antisense-RNA war ebenfalls in allen Transformanten bis auf 13-5 deutlich exprimiert.

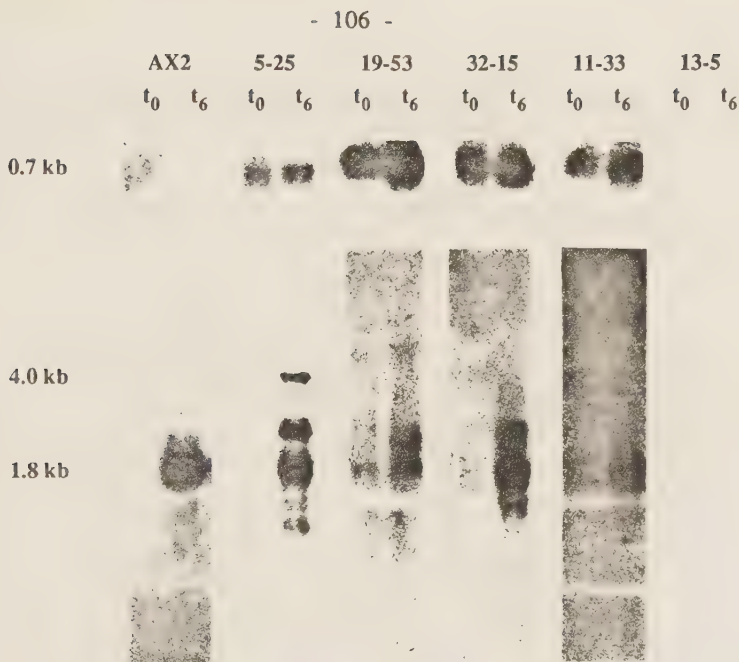


Abb. 44:

Expression der sense-RNA (unten) und der 700bp großen antisense-RNA (oben) in verschiedenen Transformanten und in AX2.

Eine kleine Anzahl von kurzstieligen Transformanten und Revertanten, die aufgrund ihrer Wildtyp-Morphologie identifiziert worden waren, wurde auf G418-haltigem Agar gezogen und zum Nachweis der RNA auf Nitrocellulose übertragen. Es konnte gezeigt werden, daß in den Revertanten die antisense-RNA verschwunden war, obwohl wegen der G418-Resistenz noch Vektor-DNA in den Revertanten vorhanden gewesen sein muß (Abb. 45).

7.1.5.2. Southern-Blots

Kontrollverdaue der pDNeo-Plasmide aus *E. coli*:

Die Sequenzen der Teilstücke, aus denen der Vektor pDNeoII zusammengesetzt ist, sind zwar bekannt, doch bestehen an den Ligationsstellen Unklarheiten über die genaue Sequenz. Daher ist auch die Restriktionskarte nicht vollständig bekannt. Aus diesem

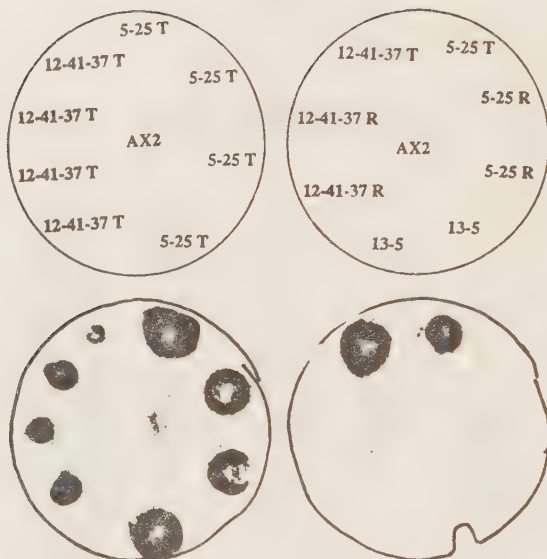


Abb. 45:

RNA-Kolonieblot von Transformanten und Revertanten der Klone 13-5, 5-25 und 12-41-37, hybridisiert mit dem antisense-spezifischen Riboprobe-Transkript des bGem4.

Grund wurden die Transformationsvektoren pDNeoII und pDNeo670/1 mit den für die spätere Analyse der genomischen DNA der Transformanten verwendeten Restriktions-enzymen verdaut, die erhaltenen Plasmid-Fragmente wurden mit RD- und TN903-spezifischen Proben hybridisiert, um Klarheit über die zu erwartenden Fragmente des Transformationsplasmids in den genomischen Southern-Blots zu erhalten. Nach den bekannten Teil-Sequenzen des pDNeoII erwartet man mit den aufgelisteten Restriktionsenzymen folgende Fragmente:

unmarkiert: Fragmente, die beiden Plasmiden gemeinsam sind.

unterstrichen: Fragmente des pDNeoII und -670/2, die die Neomycinresistenz tragen,

kursiv: Fragmente des pDNeo670/1 mit dem Insert der *Regulatorischen Untereinheit*, in Klammern neben dem pDNeoII-Fragment mit dem Polylinker, in das es inseriert ist:

EcoRI: 6200 (6800- und mehrfache bei Tandemanordnung: Da die EcoRI-Schnittstelle des Polylinkers für die blunt-end-Ligation verwendet wurde, ist sie in den pDNeo670-Vektoren nicht mehr vorhanden).

EcoRV: 680 (1340), 2250, 3770

DraI: 1670, 1220, 980, 690, 360 (1020), 290, 200, kleiner 200

RsaI: 1810, 1020, 910, 830, 680, 390, 260, 290

Während die Verdauungen mit *EcoRI*, *EcoRV* und *DraI* die erwarteten Bandenmuster ergaben, waren bei *RsaI* deutliche Abweichungen festzustellen (Abb. 46, 47): es wurden Banden von:

RsaI: 2400 (3000), 1550, 800, 650, 400 und 300bp gefunden.

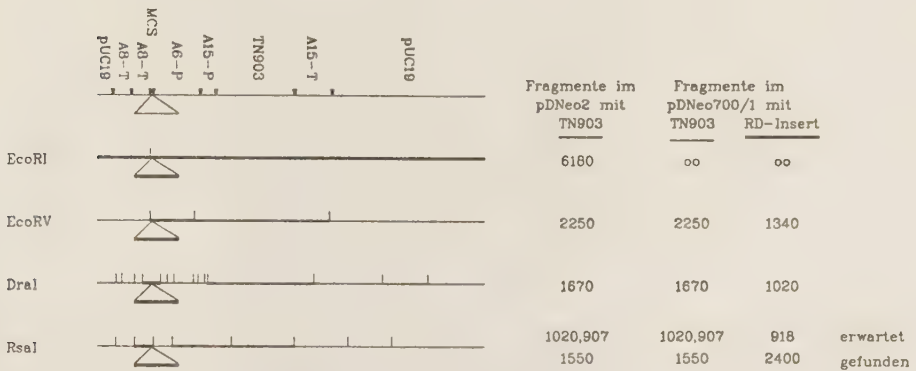


Abb. 46:
Schematische Darstellung der Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme in den Plasmiden pDNeoII und pDNeo670/1.

Das für Teile der Regulatorischen Untereinheit codierende 670bp Insert des pDNeo670/1 inseriert in das 2400bp *RsaI* Fragment des pDNeoII, wie durch die Vergrößerung dieses Spaltstückes (Abb. 47) und die Hybridisierung mit einer RD-spezifischen Probe (Abb. 48II) gezeigt werden konnte. Die Größe dieses Fragments läßt sich nur durch Fehler der Restriktionskarte des pDNeoII erklären, wenn man annimmt, daß die zwei aus der Sequenz abgeleiteten *RsaI*-Schnittstellen in der Tandemanordnung des Aktin-8-Promotors nicht existieren. Dann wird das angenommene 1810bp Fragment um die beiden benachbarten 290 und 260bp Stücke erweitert und ergibt ein 2360bp-Fragment.

Das im pDNeoII und pDNeo700/1 gefundene 1550bp Fragment trägt die TN903-Sequenzen, wie durch Hybridisierung mit dem pBL2-Insert nachgewiesen wurde (Abb. 48III). Die Lage der Schnittstellen, die zum Entstehen dieses Fragments führen, ist unklar und läßt sich nicht aus der unvollständigen Restriktionskarte des pDNeoII ableiten.



Abb. 47:

Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel von Restriktionsverdauen der Plasmide pDNeoII (I) und pDNeo670/1 (II) mit *DraI* (a), *RsaI* (b), *EcoRV* (c) und *EcoRI* (d), e = ungespaltener pDNeo670/1, M = λ -Marker 23.4, 9.6, 6.6, 4.4, 2.2, 1.95 und 0.56kb.

Genomische Southern-Blots mit DNA aus Wildtyp-Zellen und Transformanten

Die Southern-Blots mit Kern-DNA der Transformanten und des AX2 wurden mit dem Fragment des RD-Klons 10.1 hybridisiert, das zwischen den beiden *DraI* Schnittstellen liegt und fast den gesamten codierenden Bereich umfaßt oder mit dem *AvaII-EcoI* Fragment aus RD2.4, dem die 3'-nichtkodierenden Bereiche fehlen. Dadurch wurde sichergestellt, daß alle codierenden Fragmente des Gens markiert wurden.

Im Falle einer homologen Rekombination in das Gen der Regulatorischen Untereinheit erwartet man in den genomischen Southern-Blots Banden, die durch das Integrationsereignis gegenüber dem Wildtyp verändert sind. Im Falle einer zufälligen nichthomologen Integration oder einer Rekombination in Aktin-Gene erwartet man unveränderte Wildtyp-Banden des Gens der Regulatorischen Untereinheit und die durch die Kontrollverdaue identifizierten Restriktionsfragmente des Transformationsvektors, die in Abb. 46 zusammengefaßt sind.

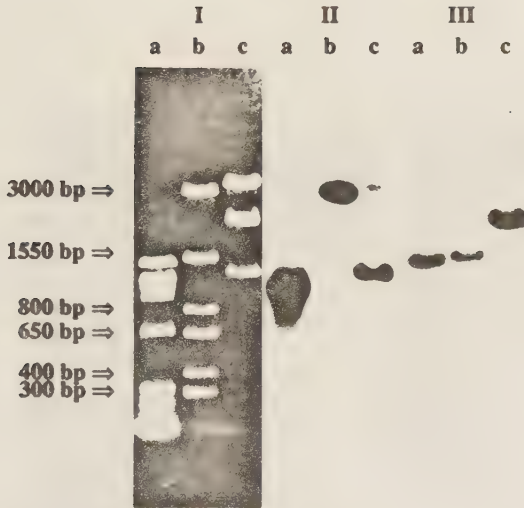


Abb. 48:

Restriktionsspaltungen des Plamids pDNeo670/1 wurden mit RD-spezifischen (II) und TN903-spezifischen (III) Proben hybridisiert, (I) Ethidiumbromid-gefärbtes Agarose-Gel. a = *DraI*, b = *RsaI* c = *EcoRV*.

EcoRI (Abb. 49I):

Die R-spezifische Probe markiert sowohl im *EcoRI*-Verdau der AX2-DNA als auch der DNA der pDNeoII-Kontrolltransformante ohne Insert (nur schwach erkennbar) ein Fragment von ca. 8500bp., die Neomycin-Resistenz-Probe erkennt in der Kontrolltransformante die Vektorbande von 6800bp. In den Transformanten 5-25 und 12-41-37 konnte man mit der R-spezifischen Probe die gleiche 8500bp Bande nachweisen wie im Wildtyp. Zusätzlich zu der Bande des endogenen Gens fand sich eine große Vektorbande von deutlich mehr als 23.4kb. Da *EcoRI* im Transformationsvektor nicht schneidet, zeigte die Größe und Intensität dieser Bande, daß der Transformationsvektor in multiplen Kopien in Tandemanordnung im Genom vorliegt. Ausserdem scheint in der Transformante 12-437 eine weitere Integration des Vektors an einer zweiten Stelle stattgefunden zu haben, die zu einer zusätzlichen 6800bp Bande führte.

DraI (Abb. 50I):

Im *DraI*-Verdau des Wildtyps konnten die beiden im cDNA-Klon codierten Schnittstellen nachgewiesen werden und eine zusätzliche im Intron, die zu einer Spaltung des Gens in zwei Fragmente von ca. 500 und 600bp führte (Abb. 50C). Da für die Hybridisierung das *DraI*-Fragment des cDNA-Klons verwendet wurde, werden die flankierenden Teile des Gens nicht markiert, nur die codierenden Bereiche leuchten auf. In den Transformanten

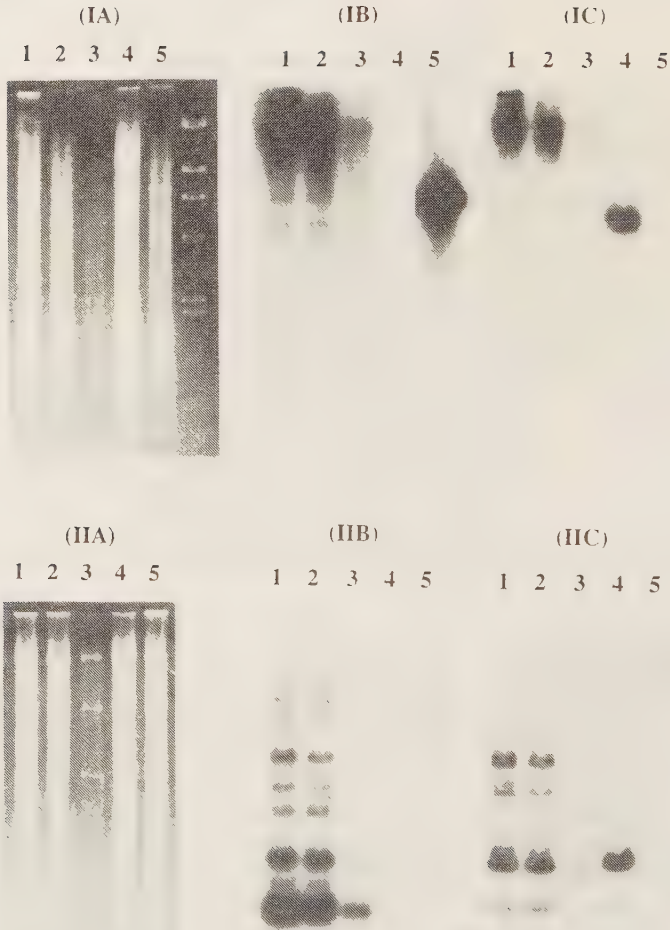


Abb. 49

EcoRI-(I) und *EcoRV*-Verdau (II) genomischer DNA verschiedener Stämme: 1 = 12-41-47/1, 2 = 12-41-37/2, 3 = 5-25, 4 = pDNeo-Kontrolltransformante, 5 = AX2; (A) = Ethidiumbromid-gefärbtes Gel vor dem Blotten, λ -Marker neben dem *EcoRI*-Verdau (B) = hybridisiert mit nicktranslatiertem *AvaII-EcoI* Fragment aus RD2.4 (Regulatorische Untereinheit); (C) = hybridisiert mit dem 1400bp *BglII*-Fragment aus pBL2 (Neomycinresistenz);

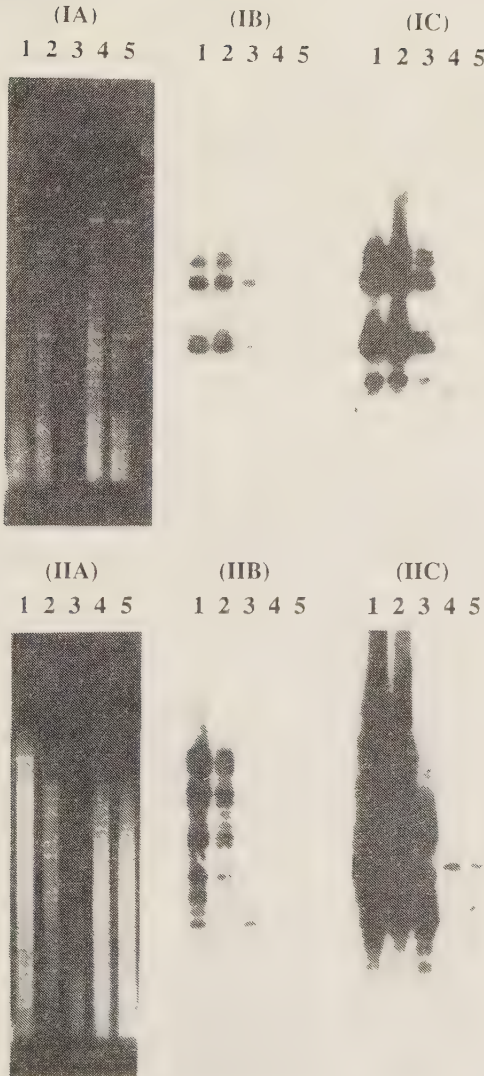


Abb. 50:

*Dra*I- (I) und *Rsa*I-Verdau (II), (A) = Ethidiumbromid gefärbtes Gel, Blots hybridisiert mit nicktranslatiertem *Ava*II-Fragment aus RD2.4 (Regulatorische Untereinheit), exponiert für 1 Tag (B) und 3 Tage (C), 1 = 12-41-47/1, 2 = 12-41-37/2, 3 = 5-25, 4 = pDNeoII-Kontrolltransformante, 5 = AX2;

fand man zusätzlich zu einer Vielzahl von Vektorbanden (Abb. 50B) auch im *DraI*-Verdau die Wildtypbanden in allen Transformanten wieder (Abb. 50C).

EcoRV (Abb. 49II):

Im Verdau der AX2-DNA wurde das Gen der Regulatorischen Untereinheit, wie nach der Restriktionskarte des cDNA-Klons zu erwarten, in zwei Fragmente gespalten. Diese Fragmente waren 8500 und 2300bp groß. In den Transformanten zeigte der *EcoRV*-Verdau, wie auch die *DraI* und *RsaI*-Spaltungen eine überraschende Komplexität: Zusätzlich zu der nach den Kontrollverdauen des pDNeo670/1 (Abb. 47, 48) erwarteten Hauptbande des Vektors von 1350bp wurde eine Vielzahl größerer Fragmente gefunden. Im *EcoRV*-Verdau der Transformanten war die 8500bp Bande des endogenen Gens unverändert erhalten, über die kleine endogene Bande von 2300bp kann man keine Aussagen machen, da sie unter einer der vielen Vektorbanden verschwand und nicht mehr identifiziert werden konnte .

RsaI (Abb. 50II):

Die Banden des endogenen Gens im AX2-Wildtyp wiesen eine Größe von ca. 1550 und 1100bp auf. Diese Banden waren in den Restriktionsverdauen der Transformanten kaum zu identifizieren. Die große endogene Bande war selbst im Original-Blot nur schwer zu erkennen, die kleine Bande verschwand vollständig unter den vielen Vektorbanden. Auch im *RsaI*-Verdau der Transformanten wurde mit der R-spezifischen Probe eine Vielzahl von Vektor-Banden markiert, die größer waren als erwartet und sich dem Verdauemuster des Transformationsplasmids nicht zuordnen ließen.

Bei den Hybridisierungen der genomischen Verdauere konnte in den Verdauen in denen die endogenen Fragmente von den Vektorfragmenten klar zu unterscheiden waren (*EcoRI* und *DraI*), in allen Transformanten die Wildtypbanden gefunden werden, die Transformanten können also nicht durch Gendisruption entstanden sein (siehe Diskussion 7.2)

7.2. DISKUSSION

In den letzten Jahren sind für *Dictyostelium discoideum* Transformationssysteme entwickelt worden, die zum einen auf Integrations-Vektoren (Nellen et al., 1984; Nellen & Firtel, 1985; Knecht et al., 1986), zum anderen auf extrachromosomalen Plasmiden beruhen (Firtel et al., 1984). Die integrierenden Vektoren wurden sowohl für die antisense-Transformation (Crowley et al., 1985; Knecht et al., 1987) als auch für Gendisruption (De Lozanne & Spudich, 1987; Witke et al., 1987) erfolgreich eingesetzt. Für meine Experimente wurde der integrierende Vektor pDNeoII verwendet. Er war ursprünglich konstruiert worden, um durch Einführen von anti-sense Transkripten in die Zellen die endogenen mRNAs spezifisch auszuschalten und auf diese Weise Transformanten zu erhalten, denen ein bestimmtes Protein fehlt. Die bis jetzt mit diesem Vektor erhaltenen Protein-defizienten Klone (des α -Actinins, des 120kD Gelation-factors, der csA und des P29F8-Proteins) wurden mit einer Frequenz von 1-10% unter den transformierten G418-resistenten *Dictyostelium*-Klonen gefunden. Im Falle des α -Actinins war eine verkürzte mRNA ein Hinweis auf eine Insertion des Vektors in das endogene Gen durch homologe Rekombination an der Stelle, an der die mRNA abbricht (Witke et al. 1987). Dies konnte durch Southern-Analysen bewiesen werden (Noegel & Witke, 1988). Auch in den anderen oben erwähnten Minus-Transformanten wurde die Expression des Proteins durch homologe Rekombination ausgeschaltet (Noegel, pers. Mitt.). In der Mehrzahl der transformierten Klone integriert der Vektor an unspezifischen, nicht charakterisierten Stellen ins Genom. Die 1-10% Ausbeute an Minus-Phänotypen entspricht der relativen Häufigkeit der homologen Rekombination gegenüber der zufälligen Integration.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Transformationen mit pDNeo-Konstrukten, die Teile der cDNA der Regulatorischen Untereinheit als Inserts enthielten, wurden zwei Gruppen mit reduzierten Mengen an Protein gefunden:

- 1) die nichtaggregierenden Transformanten (z.B. 9-30, 11-33, 33-15 und 32-15)
- 2) die kurzstieligen Transformanten (z.B. 19-53, 5-25 und 12-41-37)

Transformationsmechanismus in den nichtaggregierenden Klonen

In den nichtaggregierenden Transformanten konnte in vegetativen Zellen keine Regulatorische Untereinheit detektiert werden, erst während des Hungerns synthetisierten die Zellen R in Mengen, die denen vegetativer AX2-Zellen vergleichbar sind. Die antisense-RNA ist stark expremiert, die mRNA kaum nachweisbar (wie auch in vegetativen AX2-Zellen), was die Interpretation zuläßt, daß es sich bei den morphologischen Defekten um antisense-Effekte handelt.

Dennoch ist mit den verfügbaren Daten keine Entscheidung möglich, ob es sich bei diesen Transformanten um einen spezifischen Defekt der Regulatorischen Untereinheit handelt. Abgesehen von dem Argument, daß mit einem R-spezifischen Fragment transformiert

wurde, treten bei diesen Transformanten die gleichen Probleme auf, wie sie bereits für die Mutante HG778 diskutiert wurden, nämlich Ursache und Wirkungen des Fehlens der Regulatorischen Untereinheit auseinanderzuhalten. Die Möglichkeit besteht, daß durch zufällige Integration in ein anderes für die Entwicklung benötigtes Gen die Differenzierung blockiert und die Transkription der R-RNA unterbunden ist. Wegen der starken Reduktion der Regulatorischen Untereinheit sind diese Mutanten jedoch besonders interessant. Obwohl der *DraI*-Verdau gegen homologe Rekombination spricht (Abb. 50, Diskussion siehe unten) werden weitere Untersuchungen folgen, um durch genomische Southern-Blots mit anderen Restriktionsenzymen nach Hinweisen auf Gendisruption zu suchen oder durch Nachweis von sense-antisense RNA-Hybriden den antisense-Mechanismus der Transformation zu belegen.

Die "Transformante" 13-5 wird im Folgenden außer Betracht bleiben, da sie kein primärer Phänotyp ist: sie ist aus einem kurzstieligen Klon hervorgegangen, hat eine Veränderung des Phänotyps vollzogen und revertiert weiter zum Wildtypphänotyp, exprimiert keine antisense-RNA und ist nicht Neomycin-resistent.

Inaktivierung der Regulatorischen Untereinheit durch anti-sense-RNA bei den kurzstieligen Klonen

Bei den morphologischen Veränderungen der kurzstieligen Transformanten handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um spezifische Effekte der Transformation.

1. Die Reversionen des Phänotyps sind immer mit einem Wiedererscheinen des Proteins gekoppelt.
2. In einer Kontrolltransformation mit pDNeoII, wurden keine morphologisch aberranten Klone gefunden.
3. Der gleiche Phänotyp wurde in zwei unabhängigen Transformationen mit einer Häufigkeit von ca. $1-2 \times 10^{-3}$ der G418-resistenten Zellen gefunden. Diese Frequenz liegt deutlich über den von Mutagenesen bekannten Häufigkeiten von Proportionsmutanten mit veringierter Anzahl von (Prä)Stiel-Zellen, die bei höchstens 1×10^{-4} liegt (MacWilliams, pers Mitt.).

Um zwischen den Inaktivierungsmechanismen der antisense-RNA bzw. der Gendisruption unterscheiden zu können, wurden RNA- und DNA-Analysen der Transformanten durchgeführt. Daß in Immunoblots bei allen Transformanten das 40kD Protein der Regulatorischen Untereinheit zumindest in hungernden Zellen nachgewiesen werden konnte, sprach gegen eine Gendisruption. Bei den kurzstieligen Transformanten bestand jedoch die Möglichkeit, daß dieses Protein ausschließlich von Revertanten stammt. Zusätzlich mußte mit der Möglichkeit gerechnet werden, reduzierten Mengen Wildtyp-Protein führen. Dies war besonders deshalb denkbar, weil als Insert für den Transformationsvektor ein Fragment aus der C-terminalen Hälfte des cDNA-Klons RD10.1 verwendet wurde, das bei Rekombination am Ende

des Gens die Transkription und die Translation einer veränderten RNA möglicherweise nur unwesentlich stört.

Den alternativen Inaktivierungsmechanismus stellt eine unvollständigen Elimination der mRNA durch die Vektor-kodierte antisense-RNA dar.

Die DNA-Analysen ergaben klare Aussagen gegen die Gendisruption. Für die Verdaue waren ausschließlich solche Enzyme ausgewählt worden, die zwischen Vektor-DNA und endogenem Gen unterscheiden können:

- EcoRI*: im endogenen Gen befindet sich keine Schnittstelle; im Insert des Plasmids pDNeo670/1 ist keine Schnittstelle, die Schnittstelle des Polylinkers ist durch die blunt-end-Ligation zerstört.
- EcoRV*: Die im endogenen Gen vorhandene Schnittstelle ist im Insert des Vektor durch die blunt-end-Ligation zerstört.
- DraI*: Zwei Schnittstellen befinden sich im codierenden Teil den Gens, eine im Intron; die letzte *DraI* Schnittstelle, die sich am 3'-Ende des Inserts befindet, ist durch die Ligation verloren.
- RsaI*: Die *RsaI*-Schnittstelle des endogenen Gens liegt außerhalb des Inserts der Transformationsvektors.
- KpnI*: pDNeoII und pDNeo670/1 besitzen eine *Kpn*-Schnittstelle im Polylinker, das Gen der Regulatorischen Untereinheit keine.

Trotzdem konnten in keinem der Verdaue verschiedener Transformanten Größenänderungen der genomischen DNA-Fragmente festgestellt werden. Dies beweist, daß der Integrationsort des Transformationsvektors nicht im Gen der Regulatorischen Untereinheit liegt, d.h. daß keine homologe Rekombination mit Gendisruption stattgefunden hat.

Im Transformationsvektor pDNeo670/1 befindet sich keine *EcoRI*-Schnittstelle und deshalb charakterisiert dieser Verdau die flankierenden Teile der Integrationsorte. Bei einer homologen Rekombination in das Gen der Regulatorischen Untereinheit müßte eines der beiden genomischen Fragmente um die 6850bp des Vektors vergrößert sein und man dürfte keine zusätzliche, auf einem getrennten Fragment lokalisierte Markierung finden (Abb. 51A). Das Gegenteil ist jedoch der Fall: die Wildtypbande ist unverändert und die Vektorkopien liegen auf einem anderen Fragment. Der Vektor hat also nicht in das endogene Gen integriert.

An der Intensität der Bande ist zu erkennen, daß der Vektor in multiplen Kopien im Genom vorliegt. Die Größe der Bande zeigt, daß die integrierten Vektoren nebeneinander im Genom vorliegen, da sie nach dem Verdau nicht auf getrennten Fragmenten liegen.

Wegen der Anwesenheit von Schnittstellen sowohl im Gen als auch im Vektor wäre die Situation im *DraI*-Verdau bei homologer Integration etwas komplizierter als im *EcoRI*-Verdau. Die Größe der hypothetischen Fragmente hängt vom Integrationsort des Vektors

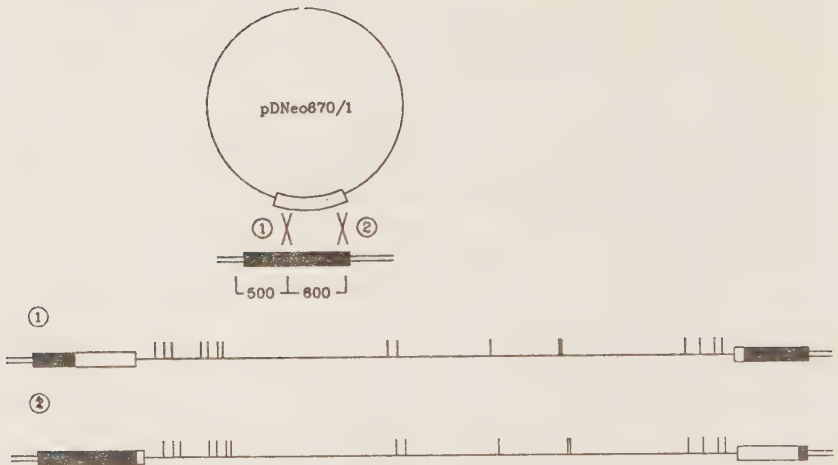


Abb. 51:

Zu erwartende Fragmente im *DraI*-Verdau genomischer DNA bei homologer Rekombination. Angegeben sind die Frössen der von dem *DraI*-Fragment erkannten Spaltstücke in bp. 1 = Integration vor dem Intron, 2 = Integration nach dem Intron.

ab (Abb. 51). Man muß aber in allen Fällen drei Fragmente erwarten, eine Bande müßte die gleiche Größe haben wie im Wildtyp, eine Bande des endogenen Gens müßte vergrößert sein um einen Teil des 1020bp-Fragments des Vektors, das das RD-Insert trägt, der Rest dieses Fragments müßte als kleineres Spaltstück identifizierbar sein. Diese Größen der drei Fragmente müßten sich zu ca. 2200bp aufaddieren (ca. 1040bp des endogenen Gens plus dem Intron von ca 100-150bp und 1020bp des Vektorfragments). Doch auch im *DraI*-Verdau findet man die beiden Wildtypbanden unverändert wieder. Die Befunde des *EcoRI* und *DraI*-Verdaus beweisen, daß bei den untersuchten Transformanten der Vektor nicht in das endogene Gen integriert hat.

Obwohl die Möglichkeit besteht, daß die Wildtypfragmente der Transformanten von Revertanten der Population stammen, sprechen die Mengenverhältnisse dagegen: Im *DraI*-Verdau wurden bis auf den Stamm 5-25 jeweils gleiche Mengen DNA geladen und eine mit dem Wildtyp vergleichbar starke Markierung der endogenen Fragmente gefunden, obwohl die Revertanten nur in geringen Prozentzahlen in den Populationen vorkamen.

Überraschenderweise konnten jedoch die in den Kontrollverdauen identifizierten Restriktionsfragmente des Transformationsvektors (Abb. 48) nicht gefunden werden.

Stattdessen wurde besonders im *EcoRV*- und im *RsaI*-Verdau eine Vielzahl unterschiedlich großer Fragmente sowohl mit der RD- als auch mit der TN903-spezifischen Hybridisierungsproben markiert. Für diese Heterogenität konnte keine befriedigende Erklärung gefunden werden. Die Komplexität der Bandenmuster läßt sich nicht durch eine einfache Integration und Amplifikation erklären. Überraschenderweise liegen oft RD- und TN903- Sequenzen auf den gleichen Fragmenten, obwohl laut Restriktionskarte des pDNeoII und nach den Kontrollverdauen Schnittstellen zwischen diesen Vektorteilen liegen müßten (bes. *DraI* und *EcoRV*, Abb. 46).

Die Vielzahl an R-spezifischen Banden könnte durch unabhängige Integrationsorte für jede Vektorkopie erklärt werden. Der *EcoRI*-Verdau beweist jedoch die Tandemanordnung der Mehrzahl der integrierten Kopien im Genom (Abb. 49I).

Zwei weitere Erklärungen sind denkbar:

1. De Lozanne und Spudich (pers. Mitt.), beschreiben für eine Myosin-Gendisruptions-Transformante ein doppeltes Integrationsereignis: Im Genom befinden sich zwei Kopien des Vektors, die nicht hintereinander angeordnet sind, sondern eines der beiden Transformationsplasmide war in das zweite Plasmid integriert, so daß komplizierte Verdaumuster resultierten.
2. Die hohe Reversionsfrequenz unter Beibehaltung der Neomycinresistenz demonstriert das Auftreten von Veränderungen der Vektor-DNA. Solche Veränderungen oder Fehler bei der Vektoramplifikation könnten zu den beobachteten Verdauusername führen.

Die Daten der RNA-Analysen liefern klare Hinweise auf einen antisense-Transformationsmechanismus. Die Hybridisierung mit der sense-spezifischen Probe zeigten z.T. deutliche Abnahmen der RNA-Mengen (19-53, 9-30, 13-5) und veränderte RNA-Größen (5-25, 32-15), in allen Transformanten konnte jedoch die Wildtyp-RNA-Spezies detektiert werden, ebenso wie die antisense-RNA. Alle drei RNA-Größen (vergrößerte und verkleinerte RNA-Spezies, Wildtyp-mRNA) lassen sich durch antisense-Effekte erklären, wenn man annimmt, daß die Bildung der sense-antisense Duplex-RNA das Prozessieren des Introns verhindert (größere RNA) und zum Abbau der RNA führt (weniger und kleinere RNA). Wildtyp-mRNA sind die RNA-Moleküle, die der Hybridisierung mit der antisense-RNA entgehen. Eine solche Heterogenität der Banden ist auch für das Präspor-spezifische Gen EB4 beschrieben. Nach Dissoziation von Slugzellen wird die RNA destabilisiert und natürliche Transkripte des nichtkodierenden Stranges des endogenen Gens werden synthetisiert. Wenn das antisense-Transkript akkumuliert, wird die mRNA abgebaut und geringe Mengen von vergrößerten und verkleinerten sense-RNAs werden nachweisbar (Nellen, pers. Mitt.).

Die RNA-Befunde der Transformanten der Regulatorischen Untereinheit stehen im Gegensatz zu den beschriebenen Gendisruptionstransformanten (Witke et al., 1987, De Lozanne & Spudich, 1987), in denen man nur *eine* RNA-Spezies findet, deren Größe wegen der Lage der integrierten Vektor-Terminatoren verändert ist. Dagegen liegt bei den Transformanten der Regulatorischen Untereinheit die Wildtyp-RNA-Spezies immer gleichzeitig mit den abnormen RNAs vor.

Bei den Transformanten ereignen sich morphologische Reversionen gekoppelt mit dem Verlust der antisense-RNA, was ein starkes Argument gegen den Gendisruptionsmechanismus ist. Diese Reversionen ereignen sich auch unter G418-Selektion, die Revertanten haben also nicht den gesamten Vektor verloren sondern nur die Fähigkeit zur Produktion der antisense-RNA, die Neomycin-Resistenz bleibt erhalten.

Die in Gesamt-RNA nachweisbare Menge an antisense-RNA ist gering, doch nicht so extrem wie in antisense-Transformationen aus der Literatur (Crowley et al., 1985), bei denen sich die antisense-RNA nur in Run-off-Experimenten, nicht jedoch in gesamt-RNA nachweisen ließ. Dies wurde auf effiziente Hybridisierung und anschließenden Abbau der Duplex-RNA zurückgeführt. Die geringe Menge nachgewiesener antisense-RNA ist deshalb kein Argument gegen den antisense-Mechanismus der Transformation.

Die folgenden Argumente sprechen also für antisense-Effekte in den Transformanten:

1. Die Anwesenheit von geringen Mengen Protein
2. Die Anwesenheit von Wildtyp RNA-Spezies in den Transformanten
3. Die Wildtypfragmente der genomischen Southern-Blots des *EcoRI* und *DraI*-Verdaus
4. Das Fehlen der antisense-RNA in Revertanten
5. Es ist bemerkenswert, obwohl statistisch nicht gesichert, daß in der Transformation mit dem pDNeo670/2-Vektor, der das Insert in sense-Orientierung enthält, keine Klone mit Reduktionen der Regulatorischen Untereinheit gefunden wurden.

Ist Gendisruption der Regulatorischen Untereinheit ein letales Ereignis?

Dieses Ergebnis bedeutet, daß unter ca. 6000 getesteten Klonen, die Abkömmlinge von ca. 1000 Primärkolonien sind, keine Gendisruption der Regulatorischen Untereinheit gefunden werden konnte. Dies steht im Gegensatz zu den verfügbaren Daten über Häufigkeiten homologer Rekombination mit Gendisruption. Der Anteil an Rekombinanten unter den G418-resistenten Klonen betrug bei der Myosin-Transformation 30% (De Lozanne & Spudich, 1987), bei α -Actinin ca. 6% (Witke et al., 1987), bei anderen Cytoskelett-Proteinen und csA 1-10%, α -Actinin und 120kD Gelationfactor Doppeltransformation 1% (Noegel, pers. Mitt.).

Das negative Ergebnis könnte zum einen auf zufällige Eigenheiten einzelner Transformations-Experimente zurückzuführen sein. Im Falle der csA z.B. konnten nur aus zwei von vier durchgeführten Transformationen Minus-Transformanten isoliert werden (Harloff, pers. Mitt.). Für die Regulatorische Untereinheit wurden insgesamt drei Transformationen ohne erfolgreiche Gendisruption durchgeführt, zwei mit Inserts in antisense-Orientierung, eine mit Insert in sense-Orientierung. Zufälligkeiten können also nicht ganz ausgeschlossen werden.

Andererseits muß man mit der Möglichkeit rechnen, daß man keine Minusmutanten findet, weil es sich bei der homologen Integration um ein letales Ereignis handelt oder die betroffenen Klone einen starken Selektionsnachteil gegenüber den zufällig integrierenden Transformanten haben. Bis auf die Myosin-Transformanten, die in

Suspensionskultur nicht teilungsfähig sind und auf festen Substraten keine normale Cytokinese zeigen (De Lozanne & Spudich, 1987), zeigen sich alle Minus-Transformanten in ihrer Vitalität nahezu unbeeinflusst vom Integrationsereignis (Witke et al., 1987; Noegel, pers. Mitt.). Dies war jedoch im Falle der anderen Cytoskelett-Proteine und der csA nicht unerwartet, da schon MNNG-Mutanten ohne morphologischen Defekt gefunden worden waren (Noegel et al., 1985; Wallraff et al., 1986).

Bei einem Fehlen der Regulatorischen Untereinheit muß man aber mit starken Schädigungen der Zellen rechnen, da in anderen Systemen wie z.B. Hefe Mutationen der Untereinheiten der cAdPK drastische Effekte auf die Lebensfähigkeit der Zellen haben (Nurse, 1985).

Die wichtige Frage, ob Gendisruption der Regulatorischen Untereinheit in *Dictyostelium* überhaupt möglich ist, ließe sich am Besten mit einem Vektor klären, der nur zur Gendisruption fähig ist und nicht zusätzlich antisense-Effekte hervorrufen kann. Ideal wäre ein linearisiertes Integrationsfragment, bei dem codierende Teile des zu treffenden Gens durch die Neomycinresistenzbox (*Dictyostelium*-Promotor plus TN903 plus *Dictyostelium*-Terminator) ersetzt sind. Solche Transformationen mit linearisierter DNA funktionieren effizient in *Dictyostelium* und führten im Falle des Myosins im Gegensatz zu den plasmid-transformierten Klonen zu stabilen Transformanten (Spudich, pers. Mitt.).

Der kurzstielige Phänotyp der Transformanten

Das Ziel der Transformationen war es, aufgrund der Eigenschaften der Defekt-Mutanten auf Wildtypfunktionen der cAMP-abhängigen Proteinkinase zu schließen. Voraussetzungen für eine solche Analyse sind das Auffinden von Protein-Defektmutanten mit morphologisch aberrantem Phänotyp und der Nachweis, daß beide Eigenschaften gekoppelt sind.

Abgesehen von der Vitalität der Zellen in der vegetativen Phase (siehe oben) konnten während der Differenzierung bisher nur für die Discoidin-, die ras- und die Myosin-Minus-Transformanten morphologische Defekte im Entwicklungszyklus beschrieben werden. Die Transformanten des α -Actinin, des 120kD Gelationfactors und der csA weisen dagegen keine offensichtlichen Aberrationen auf.

Nach der Transformation mit einem cDNA-Fragment der Regulatorischen Untereinheit konnte dagegen ein kurzstieliger Phänotyp identifiziert werden. Diese kurzstieligen Klone, für die ein antisense-Transformationsmechanismus wahrscheinlich gemacht werden konnte, weisen trotz der beträchtlichen Restaktivität der Regulatorischen Untereinheit deutliche Verschiebungen der Zelltypproportionen in Slugs und Fruchtkörpern auf.

Der Zusammenhang zwischen der Reduktion der Regulatorischen Untereinheit und dem morphologischen Phänotyp wird am besten durch die Reversionen demonstriert, bei denen das Wiedererscheinen der Wildtypmorphologie streng gekoppelt ist mit einem

Anstieg der Regulatorischen Untereinheit. Beide Voraussetzungen für die Funktionszuweisungen sind also erfüllt.

Die Reduktion der Regulatorischen Untereinheit beeinflusst sowohl die Proportionen der Vorläuferzellen im Slug als auch der terminal differenzierten Zellen im Fruchtkörper, wo die Änderungen der Proportionen besonders auffällig sind. Dies ist keineswegs selbstverständlich, da Mutanten mit abnormen Fruchtkörpern bekannt sind, deren Proportionsregulation im Slug dem Wildtyp entspricht, die also erst in der terminalen Differenzierung gestört sind. Bis jetzt konnte erst eine kleine Anzahl von Slugproportionsmutanten mit verkleinerter Prästiel-Zone gefunden werden: Hs2 (MacWilliams, 1982), NP429, M1/10 (MacWilliams, pers. Mitt.).

Die Abnahme des Anteils der Prästiel-Zellen im Slug von 20% im Wildtyp auf 10% sieht auf den ersten Blick nicht dramatisch aus, entspricht jedoch etwa der Reduktion des Proteinniveaus der Regulatorischen Untereinheit in den Transformanten. De facto wurden noch keine Stämme mit weniger Prästiel-Zellen gefunden. Bei diesem Anteil scheint eine kritische Schwelle erreicht zu sein, bei der die Aggregate gerade noch in der Lage sind, Tups zu bilden und die Slugwanderung zu organisieren. Dafür spricht, daß die erwähnten Proportionsmutanten, die Mutante HG778, die Transformanten und die erwähnten Mutanten dazu neigen, das Slugstadium zu unterdrücken, Aggregate kulminieren wenn überhaupt dann meist am Ort ihrer Bildung; wenn Slugs gebildet werden, sind die Wanderstrecken extrem verkürzt und die Slugs kulminieren frühzeitig. Auch ist in den Mutanten und Transformanten der Proportionsdefekt mit abnormem Aggregationsmustern gekoppelt.

Im Sinne dieser Interpretation müßte dann eine weitere Reduktion der Regulatorischen Untereinheit zu Klonen führen, die über das mound-Stadium nicht hinauskommen (wie sie nach intensiver Selektion auf G418-Agar ab und zu beobachtet wurden) und letztendlich zu Aggregations-defekten Klonen wie 11-33 und 32-15 (falls es sich bei diesen Klonen um einen R-spezifischen Defekt handelt).

Die Proportionsveränderung in den Transformanten vollzieht sich in der Richtung, die man von den Modellen der Zelltypregulation auch erwarten muß. In diesen Modellen wird angenommen, daß extrazelluläres cAMP und DIF antagonistisch wirken, wobei DIF die (Prä)Stiel-Differenzierung und cAMP die (Prä)Spor-Entwicklung induziert (Williams, 1988).

Man kann ferner annehmen, daß die Signaltransduktion der Präspor-Induktion wie im cAMP-Relay über den Rezeptor zur Adenylatcyclase und über einen erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegel via cAdPK zur Phosphorylierung von Substrat-Proteinen führt. Bei einer Reduktion der Regulatorischen Untereinheit sollte der daraus resultierende Überschuß an katalytischer Untereinheit konstitutiv, d.h. unabhängig von tatsächlichen cAMP-Konzentrationen in der Zelle frei und damit aktiv vorliegen und zu einer vermehrten Phosphorylierung zellulärer Proteine führen. Dies entspricht also dem Zustand der (Prä)Spor-Induktion. Die second messenger Funktion von intrazellulärem cAMP in der Differenzierungssteuerung wird nicht nur gestützt durch (1) den

vitro Testsystemen (Oyama & Blumberg, 1986; Kwong et al., 1988; Kay, pers. Mitt.) und (2) den Befund, daß in coffeinbehandelten Zellen und Mutanten extrazelluläres cAMP nicht für alle Testklone die fehlende Adenylatcyclaseaktivität ersetzen kann (Kimmel, 1987). Auch die in dieser Arbeit gefundenen Proportionsverschiebungen in den Transformanten mit reduzierten Mengen an Regulatorischer Untereinheit der cAdPK unterstützen die Hypothese, daß intrazelluläres cAMP Steuerfunktionen in der Entwicklungssteuerung von *Dictyostelium* besitzt und weisen ihm eine aktivierende Rolle in der Spor-Differenzierung zu.

Es ist nicht anzunehmen, daß intrazelluläres cAMP der einzige Messenger ist, da über Inhibitorwirkungen Hinweise auf unterschiedliche Signaltransduktionswege gefunden wurden.

Spek et al. (1988) fanden, daß die cAMP-Induktion von zwei Präspor-spezifischen Genen durch Adenosin (einem cAMP-Antagonisten) inhibiert wird, während der stimulierende Effekt von cAMP auf Prästiel-spezifische Gene verstärkt wird. Bei beiden Prozessen werden halbmaximale Effekte bei unterschiedlichen Adenosinkonzentrationen erreicht. Die Stimulation der Prästiel-Differenzierung durch cAMP ist jedoch auf frühe Entwicklungsphasen beschränkt (Berks & Kay, 1988).

Kimmel (1987) konnte mittels Coffein, einem Adenylatcyclaseinhibitor und gleichzeitigen hohen Dosen von extrazellulärem cAMP zwischen coffeinresistenten (durch den Rezeptor vermittelten) und coffeinsensitiven Prozessen unterscheiden. Nur für die coffeinsensitiven Prozesse wird eine Signaltransduktion über intrazelluläres cAMP vermutet.

Die Heterogenität der Regulationsmuster verschiedener RNAs liefert einen weiteren Hinweis auf verschiedene Signaltransduktionsketten (Oyama & Blumberg, 1986; Barklis & Lodish, 1983; Mehdy et al., 1983; Chisholm et al., 1984; Kimmel, 1987; eigene Ergebnisse Tab. 2, 6.1.3.7.).

Intrazelluläres cAMP kann aber nicht nur als Messenger von extrazellulärem cAMP wirken, sondern als Integrator für alle extrazellulären Signale, die die Aktivität der Adenylatcyclase beeinflussen. Aktivitätsminderungen der Adenylatcyclase sind nachgewiesen für DIF (Rezeptoraffinität reduziert, cAMP-Relay inhibiert, Wang et al., 1986) und Adenosin (van Lookeren Campagne et al., 1986)), die beide als Antagonisten von extrazellulärem cAMP charakterisiert sind.

8. LITERATURLISTE

- Abe K. & Yanagisawa K., (1983) A new class of rapidly developing mutants in *Dictyostelium discoideum*: Implications for cAMP metabolism and cell differentiation. **Dev. Biol.** **95**, 200-210.
- Aiba H. (1983) Autoregulation of the *E. coli* *crp* (or CAP) gene. CRP is a transcriptional repressor for its own gene. **Cell** **32**, 141-149.
- Alcantara F. & Monk M., (1974) Signal Propagation in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. **J. Gen. Microbiol.** **85**, 312-324.
- Ashworth J.M. & Watts D.J., (1970) Metabolism of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum* grown in axenic culture. **Biochem. J.** **119**, 175-182.
- Barklis E. & Lodish H.F., (1983) Regulation of *Dictyostelium discoideum* mRNAs specific for prespore or prestalk cells. **Cell** **32**, 1139-1148.
- Baucage S.L. & Caruthers M.H. (1981) Deoxynucleoside phosphoamidites - a new class of deoxypolynucleotide synthesis. **Tetrahedron Letters** **22**, 1859-1862.
- Berks M. & Kay R.R., (1988) Cyclic AMP Is an inhibitor of stalk cell differentiation in *Dictyostelium discoideum*. **Dev. Biol.** **126**, 108-114.
- Berlot C.H., Devreotes P.N. & Spudich J.M., (1987) Chemoattractant-elicited increases in *Dictyostelium* myosin phosphorylation are due to changes in myosin localization and increase in kinase activity. **J. Biol. Chem.** **262**, 3918-3926.
- Beug H., Katz F. & Gerisch G., (1973) Dynamics of antigenic membrane sites relating to cell aggregation in *Dictyostelium discoideum*. **J. Cell Biol.** **56**, 647-667.
- Biggin M.D., Gibson T.J. & Hong G.F. (1983) Buffer gradient gels and ³⁵S label as an aid to rapid DNA sequence determination. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **80**, 3963-3965.
- Birnboim H.C. & Dola J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucl. Acids Res.** **7**, 1513-1522.
- Bozzaro S., Hagmann J., Noegel A., Westphal M., Calautti E. & Bogliolo E., (1987) Cell differentiation in the absence of intracellular and extracellular cyclic AMP pulses in *Dictyostelium discoideum*. **Dev. Biol.** **123**, 540-548.
- Bozzone D.M. & Berger E.A. (1987) Distinct developmental regulation and properties of the responsiveness of different genes to cAMP in *Dictyostelium discoideum*. **Diff.** **33**, 197-206.

- Bumann J., Wurster B. & Malchow (1984) Attractant-induced changes and oscillations of the extracellular Ca^{++} concentration in suspensions of differentiation *Dictyostelium* cells. **J. Cell. Biol.** **98**, 173-178
- Casadaban & Cohen S.N., (1980) Analysis of gene control systems by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. **J. Mol. Biol.** **138**, 179-207
- Chambers T.C., Song-Nichols J., Campbell D.S., Spitz E., Leichtling B.H. & Rickenberg H.V., (1987) Identification of nuclear substrates of the cAMP-dependent protein kinase in *Dictyostelium discoideum*. **Cell. Diff.** **20**, 217-230.
- Chisholm R.L., Barklis E. & Lodish H.F., (1984) Mechanism of sequential induction of cell-type specific mRNAs in *Dictyostelium discoideum*. **Nature** **310**, 67-69
- Clarke M., Yang J. & Kayman S.C. (1988) Analysis of the prestarvation response in growing cells of *Dictyostelium discoideum*. **Dev. Genetics** **9**, 3
- Clegg H.C., Correll L.A., Cadd G.G. & McKnight G.S., (1987) Inhibition of intracellular cAMP-dependent Protein Kinase using mutant genes of the Regulatory Type I Subunit. **J. Biol. Chem.** **262**, 13111-13119.
- Coffman D.S., Leichtling B.H. & Rickenberg H.V. (1981) Phosphoproteins in *Dictyostelium discoideum*. **J. Supramol. Struct. & Cell. Biochem.** **15**, 369-385.
- Coukell M.B. & Cameron A.M., (1986) Characterization of revertants of *stmF* mutants of *Dictyostelium discoideum*: Evidence that *stmF* is the structural gene of the cGMP-specific phosphodiesterase. **Devl. Genet.** **6**, 163-177.
- Cooper S., Chambers D.A. & Scanlon S., (1980) Identification and characterization of the Adenosin 3',5'-cyclic monophosphate binding proteins appearing during the development of *Dictyostelium discoideum*. **Biochem. Biophys. Acta** **629**, 235-242.
- Crowley T., Nellen W., Gomer R. & Firtel R., (1985) Phenocopy of discoidin minus mutant by antisense transformation in *Dictyostelium discoideum*. **Cell** **43**, 663-641.
- Darmon M., Brachet P. & Pereira da Silva L.H., (1975) Chemotactic signals induce cell differentiation in *Dictyostelium discoideum*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **72**, 3163-3166.

- Darmon M., Barrand P., Brachet P., Klein C. & Pereira da Silva L., (1977) Phenotypic suppression of morphogenetic mutants of *Dictyostelium discoideum*. **Dev. Biol.** **58**, 174-184
- Devine K.M. & Loomis W.F., (1985) Molecular characterization of anterior like cells in *Dictyostelium discoideum*. **Dev. Biol.** **107**, 364-372.
- Devine J.M., Tsang A.S., Williams J.K., (1982) Differential expression of the members of the Discoidin I Multigene Family during growth and development of *Dictyostelium discoideum*. **Cell** **28**, 793-800.
- Dinauer M., MacKay S. & Devreotes P., (1980) Cyclic 3'-5'-AMP Relay in *Dictyostelium discoideum* III: The Relationship between cAMP synthesis and secretion during the cAMP signalling response. **J. Cell. Biol.** **86**, 537-544.
- Dinauer M., Steck T. & Devreotes P., (1980b) Cyclic 3'-5'-AMP relay in *Dictyostelium discoideum* IV: Recovery after the cAMP signalling response after adaptation to cAMP. **J. Cell. Biol** **86**, 545-553.
- Dinauer M., Steck T. & Devreotes P., (1980c) Cyclic 3'-5'-AMP relay in *Dictyostelium discoideum* V: Adaptation of the cAMP signalling during cAMP stimulation. **J. Cell. Biol** **86**, 554-561.
- Dottaviomartin D. & Ravel J.M. (1978) Radiolabeling of proteins by reductive alkylation with ^{14}C formaldehyde and sodium cyanoborohydrate. **Analyt Biochem.** **87**, 562-565
- Dretzen G.M., Bellard M., Sassone-Corsi P. & Chambon P. (1981) A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. **Anal. Biochem.** **112**, 295-298.
- Durston A.J., (1976) Tip formation is regulated by an inhibitory gradient in the *Dictyostelium discoideum* slug. **Nature** **263**, 126-129.
- Europe-Finner G.N. & Newell P.C., (1985) Inositol 1,4,5-trisphosphate induces cyclic GMP formation in *Dictyostelium discoideum*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **130**, 1115-1122.
- Europe-Finner G.N. & Newell P.C. (1986) Inositol 1,4,5-trisphosphate induces calcium release from a non-mitochondrial pool in amoebae of *Dictyostelium discoideum*. **Biochem. Biophys. Acta** **887**, 335
- Europe-Finner G.N. & Newell P.C., (1987a) Cyclic AMP induces accumulation of inositol trisphosphate in *Dictyostelium*. **J. Cell Sci.** **87**, 221-229.

- Europe-Finner G.N. & Newell P.C., (1987b) GTP analogues stimulate inositol-trisphosphate formation transiently in *Dictyostelium discoideum*. **J. Cell Sci.** **87**, 573.
- Firtel R.A., Silan C., Ward T.E., Howard P., Metz B.A., Nellen W. & Jacobson A., (1984) Extrachromosomal replication of shuttle vectors in *Dictyostelium discoideum*. **Mol. Cell. Biol.** **5**, 3241-3250.
- Flockhard D.A. & Corbin J.D., (1982) Regulatory mechanisms in the control of protein kinases. **Crit. Rev. in Biochem.** **12**, 133-186.
- Frame L.T. & Rutherford C.L., (1984) Endogenous substrates for in vitro phosphorylation by cyclic AMP-dependent Protein Kinase from *Dictyostelium discoideum*. **Arch. Biochem. Biophys.** **232**, 47-57.
- Garrod D.R. & Ashworth J.M., (1982) Effect of growth conditions on development of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. **J. Embryol. exp. Morph.** **28**, 463-479.
- Gerisch G. & Hess B., (1974) Cyclic AMP-controlled oscillations in suspended *Dictyostelium* cells: their relation to morphogenetic cell interactions. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** **71**, 2118-2122.
- Gerisch G., Hagmann J., Hirth P., Rossier C., Weinhart U. & Westphal M., (1985) Early *Dictyostelium* development: control mechanisms bypassed by sequential mutagenesis. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology Volume L**, 813-822.
- Gilman A.G. (1979) A protein binding assay for adenosin 3',5'-cyclic phosphate. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **67**, 305-312.
- Gomer R.H., Armstrong D., Leichtling B.H. & Firtel R.A., (1986) cAMP induction of prespore and prestalk gene expression in *Dictyostelium* is mediated by the cell-surface cAMP receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **83**, 8624-8628.
- Gottmann K. & Weijer C.J., (1986) In situ measurements of external pH and optical density oscillations in *Dictyostelium discoideum* aggregates. **J. Cell Biol.** **102**, 1623-1629.
- Gross J.D., Bradbury J., Kay R.R. & Peycey M.J., (1983) Intracellular pH and the mechanism of pattern formation in *Dictyostelium discoideum*. **Nature** **305**, 244-245.

- Guittou M.C., Keller B.T., Part D., de Gunzburg J., Borchardt R.T., Veron M., (1988) S-Adenosylmethionin, S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase variations during differentiation of *Dictyostelium discoideum*. *Cell Diff.* **22**, 203-210.
- de Gunzburg J. & Veron M., (1982) A cAMP-dependent protein kinase is present in differentiating *Dictyostelium discoideum*. *EMBO J.* **1**, 1063-1068.
- de Gunzburg J., Hohman R., Part D. & Veron M., (1983) Evidence that a cAMP binding protein from *Dictyostelium discoideum* carries S-Adenosyl-L-Homocystein-Hydrolase activity. *Biochimie* **65**, 33-41.
- de Gunzburg J., Part d. Guiso N. & Veron M., (1984) An unusual Adenosin 3',5'-Phosphate dependent Protein Kinase from *Dictyostelium discoideum*. *Biochem.* **23**, 3805-3812.
- de Gunzburg J., Franke J., Kessin R.H. & Veron M., (1986) Detection and developmental regulation of the mRNA for the regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase of *Dictyostelium discoideum* by cell-free translation. *EMBO J.* **5**, 363-367
- Van Haastert P.J.M., Pasveer F.J., van der Meer R., van der Heijden P.R., Walsum H. & Konijn T.M., (1982) Evidence for a messenger function of cyclic GMP during Phosphodiesterase induction in *Dictyostelium discoideum*. *J. Bacteriol.* **152**, 232-238.
- van Haastert P.J.M., van Lookeren Campagne M.M. & Ross F.M., (1982) Altered cGMP-phosphodiesterase activity in chemotactic mutants of *Dictyostelium discoideum*. *Febs Lett.* **147**, 149-152.
- Haribabu B. & Dottin R.P. (1986) Pharmacological characterization of cyclic AMP receptors mediating gene regulation in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 2402-2408.
- Ishiguro A & Weeks G., (19??) Subunit composition and molecular weights of the developmentally regulated lectins from *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* **253/21**, 7585-7587.
- Juliani M.H. & Klein C., (1978) A biochemical study of cAMP pulses on aggregateless mutants of *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Biol.* **62**, 162-172.
- Kay A.C., Noce T. & Tsang A.S., (1987) Translocation of an unusual cAMP receptor to the nucleus during development of *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2322-2326
- Kimmel A.R., (1987) Different molecular mechanisms for cAMP regulation of gene expression during *Dictyostelium* Development. *Dev. Biol.* **122**, 163-171.

- Klein C., (1976) Adenylate Cyclase in *Dictyostelium discoideum* amoebae and its changes during Differentiation. **FEBS Lett.** **68**, 125-128.
- Klein P.K., Vaughan R., Borleis J. & Devreotes P., (1987) The surface cyclic AMP receptor in *Dictyostelium*. levels of ligand-induced phosphorylation, solubilization, identification of primary transcript and developmental regulation of expression. **J. Biol. Chem.** **262**, 358-364.
- Knecht D.A., Cohen S.M., Loomis W.F. & Lodish H.F., (1986) Developmental regulation of *Dictyostelium discoideum* actin gene fusions carried on low-copy and high-copy transformation vectors. **Mol. Cell. Biol.** **6**, 3973-3983.
- Knecht D.A. & Loomis W.F., (1987) Antisense RNA inactivation of myosin heavy chain gene expression in *Dictyostelium discoideum*. **Science** **236**, 1081-1086.
- Knox B.E., Devreotes P.N. Goldbeter A. & Segel L.A. (1986) A molecular mechanism for sensory adaptation based on ligand-induced receptor modification. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **83**, 2345-2349.
- Konijn T.M., van de Meene J.G.C., Chang Y.Y., Barkley D.S. & Bonner J.T., (1969) Identification of adenosin 3'5'-monophosphate as the bacterial attractant for myxamoebae of *Dictyostelium discoideum*. **J. Bacteriol.** **99**, 510-512
- Kwong L., Sobolewski A. & Weeks G. (1988) The effect on differentiation inducing factor (DIF) mediated formation of stalk cells in low-cell-density monolayers of *Dictyostelium discoideum*. **Diff.** **37**, 1-6.
- Kopachik W., Dhokia B. & Kay R.R., (1985) Selective induction of stalk cell-specific proteins in *Dictyostelium*. **Diff.** **28**, 209-216.
- Lacombe M.-L., Podgorski G.J., Franke J. & Kessin R.H. (1986) Molecular cloning and developmental expression of the cyclic nucleotide phosphodiesterase gene in *Dictyostelium discoideum*. **J. Biol. Chem.** **261**, 16811.
- Laemmli U.K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** **227**, 680-685
- Langanger G., deMey J. & Adam H., (1983) 1,4-Diazobicyclo-(2.2.2.)-Octan (DABCO) is retarding Fading of Immunofluorescence Preparations. **Mikroskopie** **40**, 237-241
- Lappano S. & Coukell M.B., (1982) Evidence that intracellular cGMP is involved in regulating the extracellular cAMP Phosphodiesterase and its specific inhibitor in *Dictyostelium discoideum*. **Dev. Biol.** **93**, 43-53.

- Lehrach H., Diamond D., Wozney J.M. & Boetker H. (1977) RNA molecular weight determination by electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. **Biochemistry** **16**, 4743-4751.
- Leichtling B.H., Tihon C., Spitz E. & Rickenberg H.V., (1981) A cytoplasmic cyclic AMP binding protein in *Dictyostelium discoideum*. **Dev. Biol.** **82**, 150-157.
- Leichtling B.H., Majerfeld I.H., Coffman D.S. & Rickenberg H.R., (1982) Identification of the regulatory subunit of γ cAMP-dependent protein kinase in *Dictyostelium discoideum*. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** **105**, 949-955.
- Leichtling B.H., Majerfeld I.H., Spitz E, Schaller K.L., Woffendin C., Kakinuma s. & Rickenberg H.R., (1984) A cytosolic cyclic AMP-dependent Protein Kinase in *Dictyostelium discoideum*. II Developmental Regulation. **J. of Biol. Chem.** **259**, 662-668.
- van Lookeren Campagne M.M.V., Schaap P., & van Haastert P.J.M. (1986) Specificity of adenosin inhibition of cAMP-induced responses in *Dictyostelium*. **Devl. Biol.** **117**, 245-251.
- Loomis W.F., (1975) *Dictyostelium discoideum*, a developmental system. Academic Press, New York.
- Loomis W.F., (1982) The development of *Dictyostelium discoideum*. Academic Press, New York.
- de Lozanne A. & Spudich J., (1987) Disruption of the *Dictyostelium* myosin heavy chain by homologous recombination. **Science** **236**, 1086-1091.
- Liu G. & Newell P.C. (1988) Evidence that cyclic GMP regulates Myosin interaction with the cytoskeleton during chemotaxis of *Dictyostelium*. **J. Cell Science** **90**, 123
- MacWilliams H.K., (1982) Transplantation experiments and pattern mutants in cellular slime mold slugs. In "Developmental Order: Its Origin and Regulation", 463-483. Alan R. Liss Inc., New York.
- MacWilliams H.K., Blaschke A. & Prause I., (1985) Two feedback loops may regulate cell-type proportions in *Dictyostelium*. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology** **50**, 770-785.
- Maeda Y., (1970) Influence of ionic conditions on cell differentiation and morphogenesis of the cellular slime molds. **Dev., Growth & Diff.** **12**, 217-227.

- Majerfeld I.H., Leichtling B.H., Meligeni J.A., Spitz E, Rickenberg H.R., (1984) A cytosolic cyclic AMP-dependent Protein Kinase in *Dictyostelium discoideum*. I. Properties. **J. of Biol. Chem.** **259**, 654-661
- Mandel M. & Higa A. (1970) Calcium dependent bacteriophage DNA infection. **J. Mol. Biol.** **53**, 159-162.
- Maniak M., Saur U. & Nellen W. (in press) A colony-blot technique for the detection of specific transcripts in eucaryotes. **Analyt. Biochem.**
- Maniatis T., Fritsch E.F. & Sambrook J., (1982) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mann S.K.O. & Firtel R.A. (1987) Cyclic AMP regulation of early gene expression in *Dictyostelium discoideum*: Mediation via the cell surface cyclic AMP-Rezeptor. **Mol. & Cell. Biol.** **7**, 458-469.
- Marsh J.L., Erfle M. & Wykes E.J. (1984) The pIC plasmid and phage vectors with versatile cloning sites for recombinant selection by insertional inactivation. **Gene** **32**, 481-485.
- Mato J.M., Krens F., van Haastert P.J.M. & Konijn T.M., (1977) Unified control of chemotaxis and cyclic AMP mediated cyclic GMP accumulation by cAMP in *Dictyostelium discoideum*. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** **77**, 339-402.
- Mato J.M., van Haastert P.J.M., Krens F.A., Rhijnsburger E.H., Dobbe F.C.P.M. & Konijn T.M., (1977) Cyclic AMP and folic acid mediated cyclic GMP accumulation in *Dictyostelium discoideum*. **FEBS Lett.** **79**, 331-336.
- Mehdy M.C., Ratner D. & Firtel R.A., (1983) Induction and modulation of cell-type-specific gene expression in *Dictyostelium*. **Cell** **32**, 763-771.
- Meinhardt H., (1983) A model for the prestalk/prespore patterning in the slug of the slime mold *Dictyostelium discoideum*. **Diff.** **24**, 191-202.
- Morris H.R., Taylor G.W., Masento M.S., Jermyn K.A. & Kay R.R., (1987) Chemical structure of the morphogen Differentiation Inducing Factor from *Dictyostelium discoideum*. **Nature** **328**, 811-814.
- Morrissey J.H., (1981) Silver stain for proteins in polyacrylamid gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Analyt. Biochem.** **117**, 307-310.

- Mutzel R., Lacombe M.-L., Simon M.-N., de Gunzburg J. & Veron M., (1987) Cloning and cDNA sequence of the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Dictyostelium discoideum*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **84**, 6-10.
- Mutzel R., Simon M.-N., Lacombe M.-L. & Veron M., (1987) Expression and properties of the regulatory subunit of *Dictyostelium* cAMP-dependent Protein Kinase encoded by λ gt11 cDNA Clones. **Biochemistry** **27**, 481-486.
- Nellen W., Silan C. & Firtel R.A., (1984) DNA-mediated transformation in *Dictyostelium discoideum*: Regulated expression of an Actin gene fusion. **Mol. Cell. Biol.** **4**, 2890-2898.
- Nellen W. & Firtel R.A. (1985) High-copy-number transformants and co-transformation in *Dictyostelium*. **Gene** **39**, 155-163.
- Nellen W., Datta S., Reymond C., Silversten A., Mann S., Crowley T. & Firtel R.A. (1987) Molecular biology in *Dictyostelium*: Tools and applications. **Meth. Cell. Biol.** **28**, 67-100.
- Noegel A., Harloff C., Hirth P., Merkl R., Modersitzki M., Stadler J., Weinhart U., Westphal M. & Gerisch G., (1985) Probing an adhesion mutant of *Dictyostelium discoideum* with cDNA clones and monoclonal antibodies indicates a specific defect in the contact site A glycoprotein. **EMBO J.** **4**, 3805-3810
- Noegel A. & Witke W. (1988) Inactivation of the α -actinin gene in *Dictyostelium*. **Developmental Genetics**, in press
- Nurse P. (1985) Yeast aids cancer research. **Nature** **313**, 631-632.
- O'Farrell P.H., (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J. Biol. Chem.** **250**, 4007-4021.
- Orlow S.J., Shapiro R.I., Franke J. & Kessin R.H., (1981) The extracellular cyclic nucleotide phosphodiesterase of *Dictyostelium discoideum*: purification and characterization. **J. Bio. Chem.** **256**, 7620
- Oyamama M. & Blumberg D.D. (1986) Interaction of cAMP with the cell-surface Receptor induces cell-type-specific mRNA accumulation in *Dictyostelium discoideum*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **83**, 4819-4823.
- Part D., de Gunzburg J. & Veron M., (1985) The regulatory subunit of cAMP-dependent Protein Kinase from *Dictyostelium discoideum*: cellular localization and developmental regulation analyzed by immunoblotting. **Cell Diff.** **17**, 221-227.

- Poff K. & Loomis W.F., (1973) Control of phototactic migration in *Dictyostelium discoideum*. **Exp. Cell Res.** **82**, 236-240
- Poole S., Firtel R.A., Lamar E. & Roewekamp W., (1981) Sequence and expression of the Discoidin I gene family in *Dictyostelium discoideum*. **Mol. Biol.** **153**, 273-289.
- Raibaud O. & Schwarz M. (1984) Positive control of transcription initiation in bacteria. **Annu Rev. Gen.** **18**, 173-206
- Raper K.B., (1940) Pseudoplasmodium formation and organization in *Dictyostelium discoideum*. **Elisha Mitchell Sci. Soc.** **56**, 241-282.
- Rigby P.W., Dieckmann M., Rhodes C. & Berg P. (1977) Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro*. **J. Mol. Biol.** **113**, 237-251.
- Romans P. & Firtel R.A. (1985) Organization of the *Dictyostelium discoideum* Actin multigene family. Flanking sequences show subfamily homologies and unusual dyad symmetries. **J. Mol. Biol.** **183**, 311-326.
- Ross. F.M. & Newell P.C., (1981) Streamers: Chemotactic mutants of *Dictyostelium discoideum* with altered cGMP metabolism. **J. Gen. Microbiol.** **127**, 339-350.
- Rossier C., Gerisch G. & Malchow D. (1978) Action of a slowly hydrolysable cyclic AMP analogue on developing cells of *Dictyostelium discoideum*. **J. Cell Sci.** **35**, 312-338.
- Russell Grove J., Price D.J. & Goodman J.A., (1987) Recombinant fragment of Protein Kinase Inhibitor blocks cyclic AMP-dependent transcription. **Science** **238**, 530-533.
- Rutherford C.L., Taylor R.D., Frame L.T. & Auck R.L., (1982) A cyclic AMP dependent protein kinase in *Dictyostelium discoideum*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **108**, 1210-1220.
- Rutherford C.L., Vaughan R.L., Cloutier M.J., Ferris D.K. & Brickey D.A. (1984) Chromatographic behavior of Cyclic AMP Dependent Protein Kinase and Its Subunits from *Dictyostelium discoideum*. **Biochem.** **23**, 4611-4617.
- Sanger F., Nicklen S. & Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **74**, 5463.
- Schaap P., van der Molen L. & Konijn T.M., (1982) Early Recognition of prespore differentiation in *Dictyostelium discoideum* and its significance for models on pattern formation. **Diff.** **22**, 1-5

- Schaap P., van Lookeren Campagne M.M., van Driel R., Spek W., van Haastert P.J.M. & Pinas J. (1986) Postaggregative differentiation induction by cyclic AMP in *Dictyostelium*: Intracellular transduction pathway and requirement for additional stimuli. **Dev. Biol.** **118**, 52-63.
- Schaap P. (1986) Regulation of size and pattern in the cellular slime molds. **Diff.** **33**, 1-16,
- Schaller K.L., Leichtling B.H., Majerfeld I.H., Woffendin C., Spitz E, Kakinuma S. & Rickenberg H.R., (1984) Differential cellular distribution of cAMP-dependent protein kinase during development of *Dictyostelium discoideum*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **81**, 2127-2131
- Schleicher M., Noegel A., Schwarz T., Wallraff E., Brink M., Faix J., Gerisch G. & Isenberg G., (1988) A *Dictyostelium* mutant with severe defects in α -actinin: its characterization using cDNA probes and monoclonal antibodies. **J. Cell Sci.** **90**, 59-71.
- Simon M.-N., Mutzel R., Mutzel H. & Veron M., (1988) Vectors for expression of truncated coding sequences in *E. coli*. Plasmid, in press.
- Simpson D.L., Rosen S.D. & Barondes S.H., (1974) Discoidin, a developmentally regulated carbohydrate binding protein from *Dictyostelium discoideum*. Purification and characterization. **Biochem.** **13**, 3487-3493.
- Sinclair J.H. & Rickwood D, (1985) Major changes in phosphorylation of non-histone proteins accompany development in the slime mold *Dictyostelium discoideum*. **Biochem. J.** **229**, 771-778.
- Small N.V., Europe-Finner G.N. & Newell P.C. (1986) Ca^{++} induces cyclic GMP formation in *Dictyostelium discoideum*. **FEBS-Letters** **203**, 11
- Southern E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments by gel electrophoresis. **J. Mol. Biol.** **98**, 503-517.
- Spek W., van Drunen K., van Eijk R. & Pauline Schaap (1988) Opposite effects of adenosin on two types of cAMP-induced gene expression in *Dictyostelium* indicate the involvement of at least two different intracellular pathways for the transduction of cAMP signals. **FEBS-Lett.** **228**, 231-234.
- Sternfeld J. & David C.N., (1981) Fate and regulation of anterior-like cells in *Dictyostelium discoideum* slugs. **Dev. Biol.** **93**, 111-118.
- Theibert A., Palmisano M., Jastorf B & Devreotes P., (1986) The specificity of the cAMP Receptor mediating activation of Adenylate Cyclase in *Dictyostelium discoideum*. **Dev. Biol.** **114**, 529-533.

- Towbin H., Staehelin T. & Gordon J., (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **76**, 4350-4354
- Town C.D., Gross J. & Kay R.R., (1976) Cell differentiation without morphogenesis in *Dictyostelium discoideum*. **Nature** **262**, 717-719.
- Tsang A.S. & Tasaka M., (1986) Identification of multiple cyclic AMP-binding proteins in developing *Dictyostelium discoideum* Cells. **J. Biol. Chem.** **261**, 10753-10759.
- Tsang A.S., Kay C.A. & Tasaka M., (1987) Expression of an altered cAMP binding protein by rapid-developing strains of *Dictyostelium discoideum*. **Dev. Biol.** **120**, 294-298.
- Vaughan R.A. & Rutherford C.L. (1987) Distribution of cAMP-dependent Protein Kinase during development in *Dictyostelium discoideum*. **Dev. Biol.** **121**, 359-367
- Wang M., van Haastert P.J.M. & Schaap P. (1986) multiple effects of differentiation-inducing factor in prespore differentiation and cyclic-AMP signal transduction in *Dictyostelium*. **Diff.** **33**, 24-28.
- Wallace L.J. & Frazier W.A., (1979) Photoaffinity labeling of cyclic-AMP- and AMP-binding proteins of differentiating *Dictyostelium discoideum* cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **76**, 4250-4254.
- Wallraff E., Schleicher M., Modersitzki M., Rieger D., Isenberg G. & Gerisch G., (1986) Selection of *Dictyostelium* mutants defective in cytoskeletal proteins: use of an antibody that binds to the ends of a-actinin rods. **EMBO J.** **5**, 61-67.
- Watts D.J. & Ashworth J.M., (1970) Growth of myxamoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. **Biochem. J.** **119**, 171-174
- Williams J.G., Ceccarelli A., McRobbie S., Mahbubani H., Kay R.R., Early A., Berks M. & Jermyn K.A. (1987) Direct induction of *Dictyostelium* prestalk gene expression by DIF provides evidence that DIF is a morphogen. **Cell** **49**, 185-192.
- Williams J.G. (1988) The role of diffusible molecules in regulationg the cellular differentiation of *Dictyostelium discoideum*. **Dev.** **103**, 1-16.
- de Wit R.J.W., Arents J.C. & van Driel R., (1982) Ligand binding properties of the cytoplasmic cAMP-binding protein of *Dictyostelium discoideum*. **FEBS Lett.** **145**, 150-154.

- Witke W. Nellen W. & Noegel A.A., (1987) Homologous recombination in the *Dictyostelium* α -actinin gene leads to an altered RNA and lack of the protein. **EMBO J.** **5**, 61-67.
- Woffendin C., Chambers T.C., Schaller K.L., Leichtling B.H. & Rickenberg H.V., (1986) Translocation of cAMP-dependent Protein Kinase to the nucleus during development of *Dictyostelium discoideum*. **Dev. Biol.** **115**, 1-8.
- Wurster B., Schubiger K., Wick U. & Gerisch G., (1977) Cyclic GMP in *Dictyostelium discoideum*. Oscillations and pulses in response to folic acid and cGMP signals. **FEBS Lett.** **76**, 141-144.
- Wurster B., Schubiger K. & Brachet P., (1979) Cyclic GMP and cyclic AMP changes to folic acid pulses during cell development of *Dictyostelium discoideum*. **Cell Diff.** **8**, 235-242.
- Wurster B. & Bumann J., (1981) Cell differentiation in the absence of intracellular Cyclic AMP pulses in *Dictyostelium discoideum*. **Dev. Biol.** **85**, 262-265
- YanischPerron C., Vierira J. & Messing J., (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences and pUC19 vectors. **Gene** **33**,

DANKSAGUNGEN

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. G. Gerisch angefertigt. Ihm gilt mein Dank für seine Betreuung und seine konstruktiven Vorschläge.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. H. K. MacWilliams bedanken für die Betreuung seitens der Universität München. Sein Interesse und Engagement für diese Arbeit haben viel zu ihrem Entstehen beigetragen.

Zu Dank verpflichtet bin ich Herrn Dr. J. Stadler für wertvolle Ratschläge und Anregungen im biochemischen Teil der Arbeit und Frau Dr A. Noegel für die ausgezeichnete Einführung in die molekularbiologischen Arbeitsmethoden.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Michel Veron und Dr. R. Mutzel vom Pasteur-Institut in Paris. Die großzügige Überlassung des cDNA-Klons für die Regulatorische Untereinheit ermöglichte erst einen Großteil der durchgeführten Experimente.

Ferner möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung bedanken, besonders bei den "Bewohnern des Ecklabors" für Ihre freundschaftliche Zusammenarbeit, stete Hilfsbereitschaft und die nette Atmosphäre.

LEBENS LAUF

- 27.9.1959: Geboren in München
- 1965 - 1969: Besuch der Grundschule an der Boschetsrieder Straße in München
- 1969 - 1978: Besuch des Thomas-Mann-Gymnasiums in München
- Juni 1978: Abitur
- Okt. 1978 - Juni 1985: Studium der Biologie and Immunologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München,
- Sommersemester 1983: Mündlicher Teil der Diplomprüfung
- Nov. 1983 - Juni 1985: Diplomarbeit am Zoologischen Institut der Universität München, Abteilung Entwicklungsbiologie mit Prof. Charles N. David und Prof. Harry K. MacWilliams
- Sept. 1985: Abschluß des Biologie-Diploms
- Juni 1985 - Aug. 1988: Doktorarbeit am Max Planck Institut für Biochemie in Martinsried, unter Anleitung von Prof. Günther Gerisch und Prof. Harry K. MacWilliams.

